Isolierung und Strukturaufklärung von Inhaltsstoffen aus Toona ciliata M.J. Roem. var. australis (Meliaceae) mit insektenfraßhemmender Wirkung

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Wolf Grimminger
aus Stuttgart

1978

28 520

Isolierung und Strukturaufklärung von Inhaltsstoffen aus Toona ciliata M.J. Roem. var. australis (Meliaceae) mit insektenfraßhemmender Wirkung

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Wolf Grimminger
aus Stuttgart

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 15.12.1978

Dekan:	Professor Dr. W. Zeil
1. Berichterstatter:	Professor Dr. W. Kraus
2. Berichterstatter:	Professor Dr. M. Hanack

Herrn Professor Dr. W. Kraus danke ich herzlich für die Stellung des Themas, für wertvolle Ratschläge und die großzügige Unterstützung dieser Arbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

Theoretischer Teil

I. Einleitung und Ziel der Arbeit.....1

II. Voruntersuchungen.....4

III. Biogenese der in Meliaceen vorkommenden Triterpenoide..6

IV. Sterole und Tetranortriterpenoide aus dem Holz von Toona ciliata var. australis.....12

1.) Einleitung.....12

2.) Isolierung der triterpenoiden Inhaltsstoffe.....12

V. Antifeeding-aktive Tetranortriterpenoide aus der Rinde von Toona ciliata var. australis.....16

1.) Extraktion der Rinde, Identifizierung und Abtrennung der aus Flechten stammenden Inhaltsstoffe Atranorin u. Zeorin.....16

a) Petrolaetherextrakt.....16

b) Aetherextrakt.....17

2.) Isolierung der Tetranortriterpenoide.....18

a) Isolierung von Toonacilin und 6-Acetoxy-toonacilin.....18

b) Isolierung von 23- und 21-Hydroxytoonacilid....19

3.) Strukturaufklärung von Toonacilin.....20

a) Hochauflösung des M^+-Peaks.....20

b) Elementaranalyse.....20

c) 90 MHz - ^{1}H-NMR-Spektrum.....20

d) PND-^{13}C-NMR-Spektrum.....23

e) IR-Spektrum.....23

f) Die Konstitution von Toonacilin.....24

g) Die Konfiguration an C^9, C^{11}, C^{12} und C^{13}.....25

h) Die Konfiguration an C^{14}, C^{15} und C^{17}.....26

i) Konfiguration und Konformation des Ringes A....27

k) Die ^{1}H-NMR-chemische Verschiebung der angulären Methylgruppen.....29

l) Die ^{1}H-NMR-chemische Verschiebung der im Methylenbereich liegenden Protonen H^5, H^6, H^9 und H^{16}, sowie der dicht beisammenliegenden Protonen H^{11}, H^{12} und H^{30}.....30

m) Die Zuordnung der ^{13}C-NMR-Daten.....39
n) Interpretation des Infrarotspektrums.....44
o) Interpretation des Massenspektrums.....45
p) Die Struktur von Toonacilin.....46
4.) Strukturaufklärung von 6-Acetoxytoonacilin.....46
a) Identifizierung durch Spektrenvergleich mit Toonacilin.....47
b) Die Struktur von 6-Acetoxytoonacilin.....50
5.) Die Strukturaufklärung der Hydroxytoonacilide....51
a) 23-Hydroxytoonacilid.....51
b) 21-Hydroxytoonacilid.....57
c) Darstellung der Hydroxytoonacilide durch Photooxidation von Toonacilin.....58
6.) Die Photooxidation von 3-Methylfuran in aprotischen Lösungsmitteln.....61
VI. Toonafolin, ein Tetranortriterpenoid aus den Blättern von Toona ciliata var. australis.....64
1.) Isolierung.....64
2.) Strukturaufklärung.....65
a) Hochauflösung des M^+-Peaks.....65
b) Elementaranalyse.....65
c) 90 MHz - ^{1}H-NMR-Spektrum.....67
d) PND-^{13}C-NMR-Spektrum.....67
e) IR-Spektrum.....68
f) Aufstellung einer ersten provisorischen Struktur.....68
g) Unterscheidung zwischen Struktur III und IV...69
h) Strukturhinweise durch chemische Umwandlungen.70
i) 360 MHz - ^{1}H - NMR-Spektrum.....72
3.) Interpretation des ^{13}C-NMR-Spektrums.....84
4.) Interpretation des Massenspektrums.....90
5.) Interpretation des Infrarotspektrums.....92
6.) Interpretation des UV-Spektrums.....94
7.) Interpretation des CD-Spektrums.....94
a) Einleitung.....94
b) Die Konformation des Ringes A.....95
c) Die Konformation des ε-Lacton-Ringes B.....98
8.) Die räumliche Struktur von Toonafolin.....99

VII. Die insektenfraßhemmende Wirkung der aus Toona ciliata isolierten Tetranortriterpenoide.....99
1.) Die Testmethode.....99
2.) Ergebnisse der Antifeeding-Tests.....101
3.) Beurteilung der Antifeeding-Tests.....107
VIII. Zusammenfassung und biogenetische Einordnung der neu gefundenen Tetranortriterpenoide.....108

Experimenteller Teil
I. Verwendete Geräte.....111
II. Herkunft des Pflanzenmaterials.....114
III. Isolierung von triterpenoiden Inhaltsstoffen des Holzes von Toona ciliata var. australis.....114
1.) Extraktion.....114
2.) Trennung der Cedrelon-Mutterlauge.....115
3.) Hydrolyse der Sterolglykoside.....117
IV. Isolierung von triterpenoiden Inhaltsstoffen aus der Rinde von Toona ciliata var. australis.....117
1.) Extraktion.....117
2.) Trennung der Extrakte.....118
Isolierung von Toonacilin.....119
Isolierung von 6-Acetoxytoonacilin.....120
Isolierung von 23-Hydroxytoonacilid.....121
Isolierung von 21-Hydroxytoonacilid.....122
3.) Acetylierung der Hydroxybutenolide.....123
4.) Photooxidation von 3-substituierten Furanen in aprotischen Lösungsmitteln.....125
Photooxidation von Toonacilin.....125
22,23-Epoxytoonacilid.....126
Photooxidation von 3-Methylfuran.....127
V. Isolierung von Toonafolin aus den Blättern von Toona ciliata var. australis.....129
1.) Extraktion.....129
2.) Trennung des Extrakts.....129
3.) Chemische Umwandlungen zur Aufklärung der Konstitution von Toonafolin.....130

Literaturverzeichnis.....134

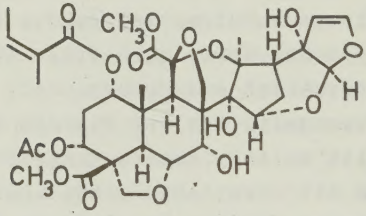
THEORETISCHER TEIL

I. Einleitung und Ziel der Arbeit

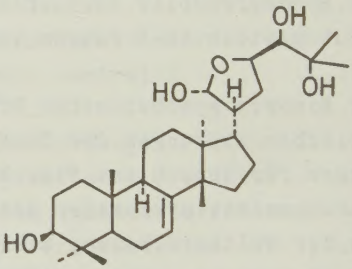
Die immer intensivere Pflanzenproduktion in Monokulturen bietet Schädlingen der betreffenden Pflanzen ideale Lebensbedingungen. Daher ist auch der Einsatz von synthetisch hergestellten Pflanzenschutzmitteln ständig im Steigen. Allein in der Bundesrepublik Deutschland hat der Absatz von Pflanzenschutzmitteln in 5 Jahren von 1972 - 1977 um 22 % zugenommen[1].

Der Einsatz synthetischer Pflanzenschutzmittel führte zu erheblichen Störungen der Ökosysteme, deren zukünftige Auswirkungen für Mensch und Tier bedrohlich erscheinen. Soll die Nahrungsmittelproduktion andererseits mit dem rapiden Ansteigen der Weltbevölkerung Schritt halten, können Eingriffe in die Ökosysteme, unter anderem mit chemischen Schädlingsbekämpfungsmitteln, nicht vermieden werden. Die Aufgabe der Forschung auf diesem Gebiet muß es sein, die zu erwartenden Risiken so klein wie möglich zu halten. Den Naturstoffchemiker interessieren dabei besonders die chemischen Methoden, welche die Pflanzen im Verlauf der Evolution selbst entwickelt haben, um ihrer Schädlinge Herr zu werden. Zur Kontrolle schädlicher Insekten entwickelten Pflanzen Insektizide, wie z.B. Pyrethroide[2], Insektenwachstumsregulatoren wie z.B. die Ecdysone[3], Repellents, das sind flüchtige Stoffe, welche die Annäherung der Insekten behindern und Antifeedants[4], nicht flüchtige Stoffe, welche die Insekten am Fressen hindern, sie aber nicht töten. Insekten haben oft eine Fraßhemmung gegen Pflanzen entwickelt, die für sie toxische oder entwicklungsstörende Inhaltsstoffe haben. Das heißt, die eben aufgezählten Wirkungen können sich überschneiden. Eine in dieser Hinsicht verhältnismäßig gut untersuchte Pflanze ist der in Südostasien und Teilen Afrikas vorkommende Nim-Baum (Azadirachta indica A. Juss, Meliaceae), der von Insekten kaum befallen und sogar

von Wanderheuschrecken gemieden wird[5]. Seine Blätter oder Früchte haben auf die verschiedensten Insekten abschreckende, fraßhemmende, entwicklungsstörende und toxische Wirkungen. Sie dienen jedoch Warmblütlern als Futter und finden in der Volksmedizin vielfältige Anwendung. Als eines der aktiven Prinzipien wurde das hochoxidierte Tetranortriterpenoid Azadirachtin (1) erkannt[6], dessen Struktur vor kurzem aufgeklärt worden ist[7]. Ähnliche Wirkungen wurden für den Persischen Flieder (Melia azedarach L., Meliaceae) nachgewiesen[5], dessen Fraßabschreckung auf der Wirkung von Meliantriol (2) beruht[8].



(1)



(2)

Eine weitere Pflanzenart, die ebenfalls kaum von Insekten befallen wird, ist die Australische "Zeder" Toona ciliata M.J. Roem. var. australis (Meliaceae)[9]. In einem breit angelegten Forschungsvorhaben in Turri alba, Costa Rica, wird die Resistenz von Toona ciliata var. australis und Khaya ivorensis aus Afrika gegen den in Lateinamerika vorkommenden Zünsler Hypsipyla grandella (Zeller) untersucht, der unter den dort heimischen Meliaceen der Gattungen Cedrela und Swietenia großen Schaden anrichtet[10]. Diese schnell wachsenden Bäume haben eine wirtschaftliche Bedeutung in der Furnierholzerzeugung (Mahagoni), können aber wegen des genannten Schädlings bisher nicht in Monokulturen gepflanzt werden.

Nun wird Toona ciliata var. australis in ihrer Heimat von dem dort lebenden Zünsler Hypsipyla robusta durchaus geschädigt,

während dort eingesetzte Spanische "Zeder" Cedrela odorata kaum angegriffen wird. Daher wurde zunächst vermutet, daß die charakteristische Zusammensetzung der aetherischen Öle der Blätter die Schädlinge ihre heimischen Futterpflanzen so gut erkennen lassen, daß sie nicht heimische nicht angreifen, auch wenn diese mit den heimischen Arten botanisch eng verwandt sind[10].

Bei gemischten Pflanzungen von Toona ciliata var. australis und Cedrela odorata war festgestellt worden, daß eine Eiablage von Hypsipyla grandella auf beiden Arten stattfand, daß die Larven im L_1-Stadium jedoch schnell starben, wenn sie auf den Blättern von Toona ciliata verblieben[11]. Daraus wurde auf Inhaltsstoffe geschlossen, die auf Hypsipyla grandella toxisch wirken. Die Zeit, in der Larven nach beginnendem Fraß an jungen Toona ciliata Pflanzen eingingen, war vergleichbar mit der bei gleichgroßen Swietenia macrophylla-Pflanzen, die durch systemisch wirkende künstliche Insektizide geschützt waren[12].

Über die chemische Struktur möglicher insektenkontrollierender Inhaltsstoffe von Toona ciliata var. australis ist bisher nichts bekannt. Das war der Anlaß, diese Meliaceen-Art auf sekundäre Inhaltsstoffe zu untersuchen, wobei in die Vorversuche auch Khaya senegalensis mit einbezogen wurde, und diese mit den hier zur Verfügung stehenden Labormethoden auf eventuelle insektenkontrollierende Wirkungen zu testen. Es hat sich gezeigt, daß Fraßtests mit dem Mexikanischen Bohnenkäfer Epilachna varvestis Muls. eine geeignete Pilotmethode dafür darstellen[13].

II. Voruntersuchungen

In Voruntersuchungen wurden die Blätter der Meliaceen-Arten Toona ciliata M.J. Roem. var. australis aus Pflanzungen in El Salvador und Khaya senegalensis A. Juss aus Nigeria untersucht. Als einheimische Pflanze wurde der Efeu, Hedera helix (Araliaceae) hinzugezogen. Die Extraktion des Pflanzenmaterials und die chromatographische Auftrennung der Extrakte wurde von mir an der Universität Stuttgart-Hohenheim durchgeführt. Die Tests machte Herr Dr. R. Steets am Phytopatologischen Institut der Universität Gießen. Diese Versuche sind detailliert in seiner Dissertation[13] beschrieben. Hier werden nur die Ergebnisse skizziert, die als Basis der vorliegenden Arbeit dienten.

Alle Blattproben wurden luftgetrocknet, fein gemahlen und mit 96proz. Aethanol mehrmals extrahiert. Die Extrakte wurden im Vakuum eingedampft, in Methanol/Wasser 95:5 aufgenommen und mit Petrolaether 30-50°C ausgeschüttelt. Die methanolischen Phasen wurden im Vakuum eingedampft und die Rückstände in 1proz. methanolischer Lösung auf Antifeeding-Aktivität getestet. Als Testtiere wurden Larven von Epilachna varivestis Muls. (Coleoptera, Coccinellidae) im L_4-Stadium verwendet. Als Futter dienten Bohnenblätter (Phaseolus vulgaris, Sorte "Saxa"), auf welche die Testlösungen mit einer Retuschierspritze aufgetragen wurden.

In diesem Test zeigten die methanollöslichen Extrakte von Toona ciliata und Khaya senegalensis fraßhemmende Wirkung, während der Extrakt aus Hedera helix völlig inaktiv war. Auf die weitere Untersuchung von H. helix wurde daher verzichtet, obwohl die Blätter im Winter gesammelt worden waren und das Ergebnis mit zu anderen Jahreszeiten gesammelten Blättern möglicherweise anders ausgesehen hätte.

Die methanollöslichen Extrakte von T. ciliata und K. senegalensis wurden durch Säulenchromatographie auf Kieselgel mit Chloroform/Aceton (7:3) grob aufgetrennt und die Fraktionen in 0.5 und 0.1proz. methanolischer Lösung auf Antifeeding-Aktivität getestet. Dabei wurde die Gewichtszunahme der Larven auf behandelten und nicht behandelten Bohnenblättern miteinander verglichen. Es zeigte sich, daß die polaren Fraktionen beider Pflanzenextrakte in 0.5proz. Lösung aufgebracht eine fraßhemmende Wirkung hervorriefen, die bei T. ciliata deutlich besser war (Tab. 1); morphogenetische Schäden waren nicht zu beobachten.

Tabelle 1: Antifeeding-Aktivität von Fraktionen steigender Polarität aus T. ciliata- und K. senegalensis-Extrakten.

T.ciliata Frakt. 0.5% in MeOH	Anf.gew. pro L_4 mg	Gew. Zunahme mg/L_4 nach 1 Tg.	2 Tg.	K.seneg. Frakt. 0.5% in MeOH	Anf.Gew. pro L_4 mg	Gew.Zun. mg/L_4 1 Tg.
Kontr.	15.59	+14.5	+24.47	Kontr.	16.26	+10.53
5	13.81	+ 1.0	+ 1.56	3	13.76	+ 7.87
6	19.13	- 1.85	- 1.79	4	16.45	+ 6.29
7	17.03	+ 0.92	+ 2.38	5	18.12	+ 3.66
8	17.13	- 2.46	- 2.31	6	22.77	+ 8.86
9	17.32	- 1.94	+ 1.52	7	19.90	+ 1.36

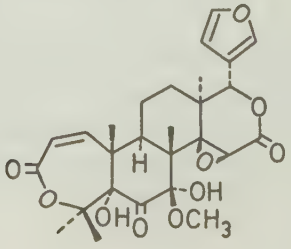
Wegen der stärkeren Antifeeding-Aktivität der Toona ciliata-Fraktionen entschloß ich mich, diese Art auf mögliche wirksame Inhaltsstoffe zu untersuchen. Leider konnte die dazu benötigte Menge Pflanzenmaterial nicht aus El Salvador bezogen werden, da die dortigen Pflanzungen erst im Entstehen waren. Dieses wurde daher aus Queensland in Australien bezogen[14)], wo die Toona ciliata var. australis heimisch ist.

Aetherextrakte von Blättern aus beiden Bezugsquellen zeigten in 0.5proz. methanolischer Lösung vergleichbare Antifeeding-Aktivität bei Epilachna varivestis.

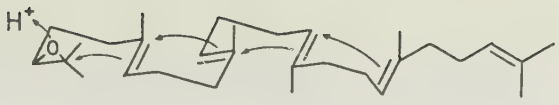
Die Dünnschichtchromatogramme der wirksamen Fraktionen (Kieselgel, Chloroform/Aceton 7:3 und Methylenchlorid/Methanol 9:1, Detektion durch Besprühen mit konz. Schwefelsäure und 1 Min. Erhitzen auf 130°) ließen vermuten, daß es sich bei den Wirkstoffen um neutrale, terpenoide Verbindungen handelt, wahrscheinlich um Triterpenoide. Der R_f-Wert von Azadirachtin (1) (Originalprobe von E.D. MORGAN) liegt im Bereich der T. ciliata-Fraktionen 5 bis 6 und der K. senegalensis-Fraktion 5. Ein Test auf Alkaloide[15] (Kieselgel, Chloroform/Diaethylamin, 9:1, Detektion mit K_2PtJ_6) verlief negativ.

III. Biogenese der in Meliaceen vorkommenden Triterpenoide

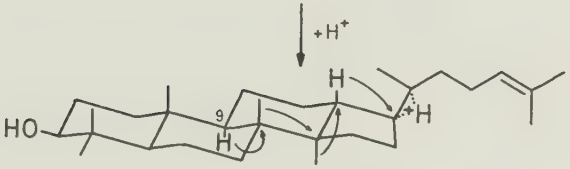
Bevor man an die Strukturaufklärung der relativ komplizierten Triterpenoide geht, ist es hilfreich, sich einen Überblick über derartige bereits in der Pflanzenfamilie bekannte Substanzen zu verschaffen. Dabei fällt auf, daß in den eng verwandten Familien der Meliaceen, Rutaceen und Simaroubaceen neben den üblichen Sterolen fast ausschließlich tetracyclische Triterpenoide oder Tetranortriterpenoide vorkommen, die aus dem Euphan- oder Apoeuphanskelett hervorgegangen sind[16]. Dazu gehören auch die wenigen bekannten Stoffe mit Antifeeding-Aktivität aus diesen Familien: Azadirachtin (1), Meliantriol (2) und Harrisonin (3)[17].



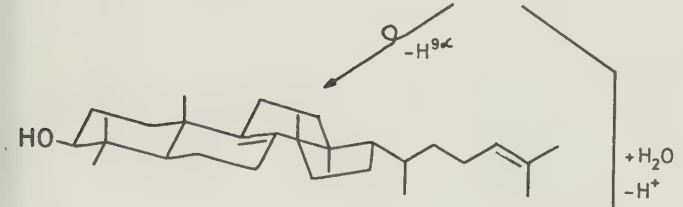
(3)



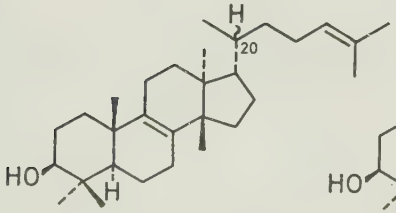
(4)



(5)

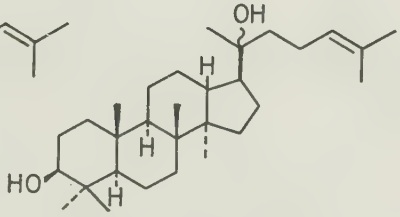


III

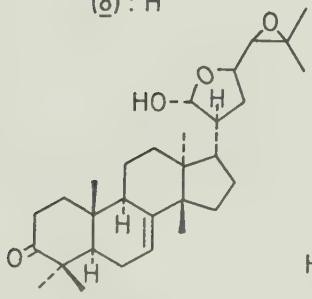


(7) : $H^{20\beta}$

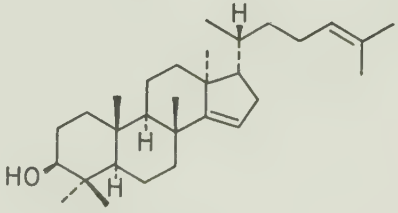
(8) : $H^{20\alpha}$



(6)

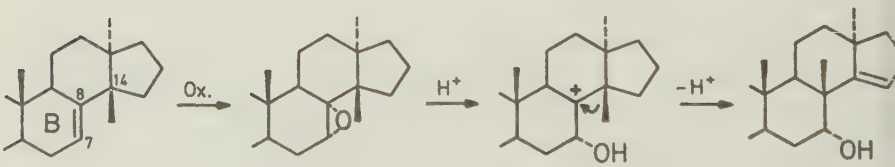


(9)



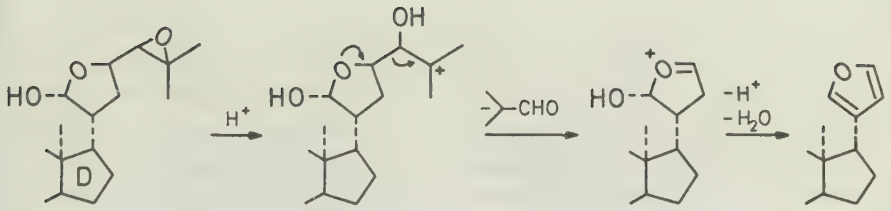
(10) Apoeuphol

Beide Skelette gehen aus Squalenepoxid (4) in der Sessel-Sessel-Sessel-Boot-Konformation hervor, dessen Cyclisierung durch einen elektrophilen Angriff an der Epoxygruppe eingeleitet wird. Das dabei entstehende Kation (5) wird mit H_2O zu Dammarendiol (6) umgesetzt. In verschiedenen Aglaia-[18] und Cabralea[19]-Arten findet man Triterpenoide, die sich vom Dammaranskelett ableiten. Kation (5) kann sich aber auch unter Verlust von H^9 zu Euphol (7) oder Tirucallol (8) umlagern. Davon leiten sich die meisten intakten Triterpenoide der Meliaceen ab. Meist ist dabei die Doppelbindung von Δ^8 nach Δ^7 verschoben. Beispiele hierfür sind Melianon (9)[20] oder das bereits erwähnte Meliantriol (2). Daraus entsteht das Apoeuphanskelett nach folgender Hypothese:
Nach Epoxidierung der Δ^7-Doppelbindung und Angriff eines Protons wandert die Methylgruppe von C^{14} nach C^8, und unter Verlust von H^{15} entsteht die Δ^{14}-Doppelbindung.

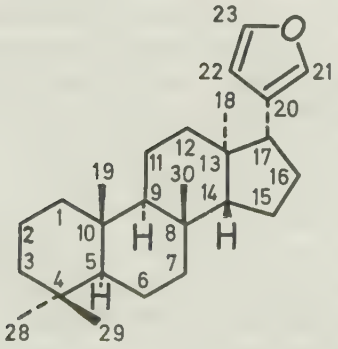


Vergl.(10)

Von dieser Stufe sind einige wenige Beispiele bekannt, wie Melianin A und B[21] aus Melia azedarach oder Grandifoliolenon[22] aus Khaya grandifolia. Sehr häufig findet man bei Meliaceen den oxidativen Abbau der C^{17}-Seitenkette. Hat die Seitenkette einen Oxidationsgrad wie bei Melianon erreicht, kann man sich den Abbau folgendermaßen vorstellen:

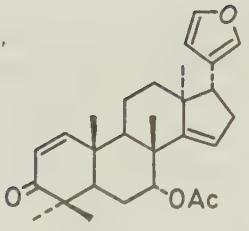


Damit ist man beim Meliacan-Stammkörper (11)[23] angelangt.

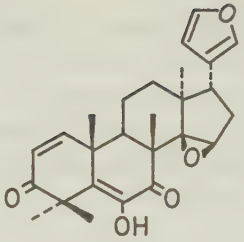


(11)

Auf dieses Gerüst kann man alle in Meliaceen vorkommenden Tetranortriterpenoide zurückführen. Das heißt, wenn man Tetranortriterpenoide in Meliaceen findet, insbesondere solche mit intakten oder oxidierten Furanresten, kann man mit einiger Sicherheit für die Konfiguration an C^5, C^8, C^9, C^{13} und C^{17} die des Meliacan- oder Apo-euphan-skeletts zunächst annehmen. Beispiele einfacher Verbindungen dieses Typs sind Azadiron (12) aus Azadirachta indica[24] oder Khaya anthotheca[25], oder Cedrelon (13) aus Toona ciliata[26].

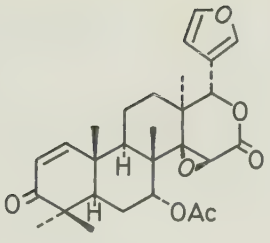


(12)

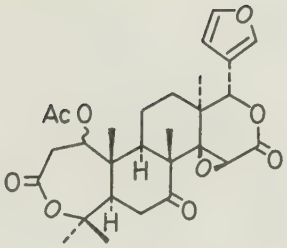


(13)

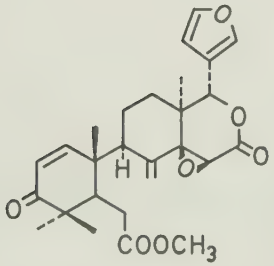
Ohne Ausnahme haben diese Tetranortriterpenoide an C^7 eine Sauerstoff-Funktion. Ist dies eine Hydroxy-, Acyloxy- oder Alkoxy-Funktion, so ist sie stets α-ständig, was auf die Stereochemie der Umlagerung vom Euphan- zum Apo-euphan-gerüst zurückzuführen ist. Weitere wichtige Sauerstoffpositionen befinden sich oft an C^3, C^{12} und C^{16}. Über Oxogruppen an diesen Positionen können die betreffenden Ringe in einer Art Baeyer-Villi ger-Reaktion zu Lactonringen aufoxidiert werden. Die in der Natur vorkommenden seco-Tetranortriterpenoide zeigen, daß dieser Reaktion oft Hydrolyse, Veresterung und Dehydratisierung folgen. Lediglich die Ring-D-Lactone bleiben als solche erhalten. Typische einfache Beispiele solcher Substanzen sind das in Meliaceen weitverbreitete Gedunin (14)[27], das in Citrusfrüchten (Rutaceae) vorkommende Nomilin (15)[28], das in Carapa- und Cedrela-Arten (Meliaceae) gefundene Andirobin (16) oder Nimbin (17)[30] aus Azadirachta indica (Meliaceae). Meist kommen die seco-Tetranortriterpenoide in vielfältiger Weise verändert in der Natur vor. Ein Beispiel hierfür ist das bereits erwähnte, antifeeding-aktive Azadirachtin (1).



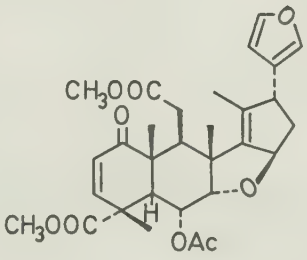
(14)



(15)

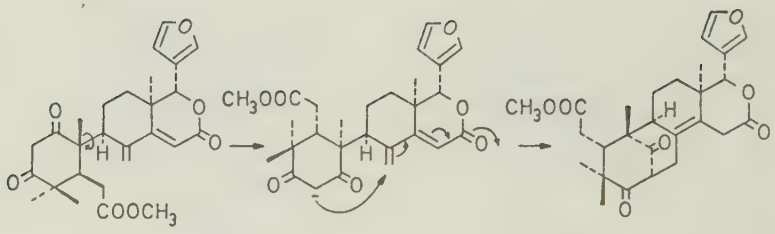


(16)



(17)

Die in Meliaceen weitverbreitete Gruppe der Bicyclononanolide geht vermutlich von einem Andirobintyp aus, dessen Ring A Oxogruppen in Position 1 und 3 trägt und dessen Ring-D-Lacton-Carbonyl in Konjugation mit der C^8-exo-Methylengruppe ist (18)[31]. Nach Drehung um die C^9-C^{10}-Bindung in die geeignete Stellung wird durch Michael-Addition das Bicyclonanolid (19) gebildet. Dieser Weg ist in einer Partialsynthese ausgehend von 7-Oxo-7-desacetoxykhivorin beschrieben worden[32]. (19) kommt als Mexicanolid[33] in Carapa-, Cedrela- und Khaya-Arten vor. Viele weitere in Meliaceen vorkommende Derivate sind bekannt.



(18) (19)

IV. Sterole und Tetranortriterpenoide aus dem Holz von Toona ciliata var. australis

1.) Einleitung

Bei der Durchsicht der Literatur über triterpenoide Inhaltsstoffe in Meliaceen war aufgefallen, daß diese oft in allen Teilen der betreffenden Pflanzen zugleich vorkommen, aus dem Holz aber am einfachsten zu isolieren waren. Um die Spektren und chromatographischen Daten der bereits bekannten oder evt. neuen triterpenoiden Inhaltsstoffe von Toona ciliata zu Vergleichszwecken zu gewinnen, wurde zunächst das Holz von Toona ciliata untersucht. Bisher sind im Holz von T. ciliata neben einigen Sesquiterpenen[34], Geranylgeraniol[35] und ß-Sitosterol[36] die Tetranortriterpenoide Cedrelon (13)[26] und Desoxycedrelon[36] gefunden worden.

2.) Isolierung der triterpenoiden Inhaltsstoffe

Beim Einengen des Petrolätherextraktes aus 3.7 kg gemahlenem Holz kristallisierten 16.5 g (0.45 %) Cedrelon (13) aus, Schmp. 206 - 208°C (aus Aceton/Äther). Die Identifizierung

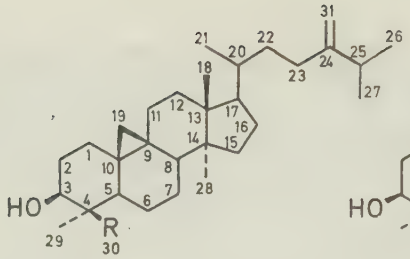
erfolgte mittels IR-, ^{1}H-NMR und ^{13}C-NMR-Spektroskopie[25] sowie massenspektrometrisch[37u.38]. Aus der Mutterlauge wurden durch Säulenchromatographie über Kieselgel mit Benzol/Essigester (9:1) eine cedrelonhaltige Fraktion A, eine cycloeucalenolhaltige Fraktion B und eine ß-sitosterolhaltige Fraktion C erhalten.

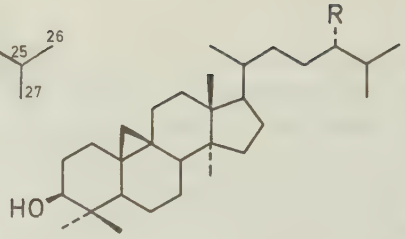
Fraktion A:

Säulenchromatographie über Kieselgel mit Methylenchlorid/Aceton (95:5) lieferte Cedrelon und eine triterpenoidhaltige Fraktion. Aus dieser wurden mittels Flüssigchromatographie unter Druck an 60 g Lichroprep Si 60 (15-25 ; E. Merck, Darmstadt) mit Methylenchlorid + 1 % Aceton 20 mg einer nicht kristallinen Substanz gewonnen, die im Massenspektrum die bereits bekannten Fragmentierungsmuster von Desoxycedrelon[36] und Dihydrocedrelon[38] zeigte. Letzteres ist bisher in den Samen, aber noch nicht im Holz gefunden worden. Von einer Trennung der beiden Substanzen wurde abgesehen, da sie noch mit schwer abzutrennenden Lipiden verunreinigt waren.

Fraktion B:

Durch Säulenchromatographie auf Kieselgel mit Methylenchlorid/Aceton (95:5) wurden 1.6 g (0.043 %) Cycloeucalenol (20), Schmp. 138°C (aus Aceton), erhalten, und durch IR-, ^{1}H-NMR[39]- und ^{13}C-NMR[40]-, sowie Massenspektren identifiziert. Die Mutterlauge lieferte nach Chromatographie an Kieselgel mit Methylenchlorid/Essigester (95:5) 300 mg (0.008 %) 24-Methylencycloartanol (21), Schmp. 122°C (aus Methanol), welches durch Vergleich der Massen[41]-, IR- und ^{1}H-NMR[25]-Spektren mit den Spektren einer authentischen Probe identifiziert wurde, die aus dem Holz von Khaya anthotheca gewonnen worden war[42]. Das ^{13}C-NMR-Spektrum von (21) ist bisher nicht veröffentlicht worden. Es wurde durch Vergleich mit den bereits bekannten Spektren[40] von Cycloeucalenol (20), Cycloartanol (22) und Cyclolaudanol (23) interpretiert (vgl. Tab. 2).





(20): R = H (22): R = H

(21): R = CH_3 (23): R = CH_3

Fraktion C:
Säulenchromatographie über Kieselgel mit Methylenchlorid/Aceton (9:1) ergab 1.6 g (0.043 %) einer kristallinen Substanz, Schmp. 137-138°C (aus Aceton). Laut FD-Massenspektrum handelt es sich um ein Gemisch von Verbindungen mit den Massen 414, 412 und 400. Dieses Gemisch konnte nur gaschromatographisch (2 m Glassäule, 4 mm Durchmesser, gefüllt mit 3 % SE-30 auf Chromosorb W; Temp. 270°C; Trägergas 1.4 atm. N_2) im Verhältnis 72 (m/e 414) : 2 (m/e 412) : 26 (m/e 400) getrennt werden. Mit Hilfe eines Testgemisches aus authentischen Proben wurden die Komponenten als ß-Sitosterol (m/e 414), Stigmasterol (m/e 412) und Campesterol (m/e 400) gaschromatographisch und ^{1}H-NMR-spektroskopisch identifiziert.

Das bereits mit Petrolaether extrahierte Holzmehl wurde anschließend noch mit Aether extrahiert. Aus diesem Extrakt schieden sich beim Einengen die bisher gefundenen Sterole als Glykoside ab, wie durch saure Hydrolyse und DC- sowie MS-Vergleich der Aglykone mit diesen Sterolen nachgewiesen wurde.

Campesterol, Stigmasterol, Cycloeucalenol und 24-Methylencycloartanol sind als Inhaltsstoffe von Toona ciliata bisher nicht beschrieben worden. Es ist allerdings nicht überraschen diese Sterole zusammen vorzufinden, denn Campesterol, ß-Sitosterol und Stigmasterol sind die Endprodukte vielstufiger Synthesen, die in zahlreichen Pflanzenarten nach der Cyclisierung von Squalenepoxid über Cycloartenol, 24-Methylencycloartanol und Cycloeucalenol als Zwischenstufen ablaufen[43].

Tabelle 2: ^{13}C-NMR-chemische Verschiebungen (δ, ppm, in $CDCl_3$) für 24-Methylencycloartanol (21) im Vergleich mit den veröffentlichten Werten[40] für (20), (22) und (23).

	(20)	(21)	(22)	(23)
C^1	30.7	32.0	31.9	31.9
C^2	34.8	30.4	30.3	30.3
C^3	76.3	78.9	78.5	78.5
C^4	44.5	40.5	40.3	40.4
C^5	43.2	47.1	47.0	47.0
C^6	24.6	21.2	21.0	21.1
C^7	28.0	28.2	28.0	28.0
C^8	46.7	48.0	47.8	47.8
C^9	23.5	20.1	20.0	20.0
C^{10}	29.5	26.2	26.0	26.0
C^{11}	25.1	26.1	26.0	26.0
C^{12}	35.2	35.6	35.5	35.5
C^{13}	45.2	45.3	45.1	45.1
C^{14}	48.7	48.9	48.7	48.7
C^{15}	32.8	33.0	32.8	32.9
C^{16}	26.9	26.6	26.5	26.5
C^{17}	52.0	52.3	52.2	52.1
C^{18}	17.7	18.0	17.9	17.9
C^{19}	26.9	29.9	29.8	29.6
C^{20}	36.0	36.2	36.0	36.5
C^{21}	18.3	18.4	18.3	18.4
C^{22}	35.0	35.1	36.4	33.9
C^{23}	31.3	31.4	24.0	31.4
C^{24}	156.2	157.0	39.4	39.0
C^{25}	33.7	33.9	28.0	30.9
C^{26}	21.8	21.9	22.5	20.5
C^{27}	21.8	22.0	22.7	17.6
C^{28}	19.1	19.4	19.3	19.3
C^{29}	14.4	25.5	25.4	25.4
C^{30}	-	14.0	14.0	14.0
C^{31}	105.6	106.0	-	15.5

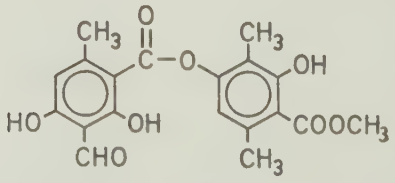
V. Antifeeding-aktive Tetranortriterpenoide aus der Rinde von Toona ciliata var. australis

1.) Extraktion der Rinde, Identifizierung und Abtrennung der aus Flechten stammenden Inhaltsstoffe Atranorin u. Zeorin

a) Petrolaetherextrakt

20.8 kg fein pulverisierte Rinde wurde 36 Std. mit Petrolaether 30-50°C im Soxhlet-Verfahren extrahiert. Der Petrolaetherextrakt, gelöst in ca. 15 l Petrolaether wurde auf 1 l eingeengt, wobei sich 8.2 g einer dickflüssigen, braunen Masse ausschieden, die nach dem Dünnschichtchromatogramm neue terpenoide Substanzen vermuten ließ. Die überstehende Lösung wurde eingedampft. Der Rückstand (49.5 g) enthielt fette Öle, Wachse und Sterole, daneben aber auch Terpenoide, die chromatographisch abgetrennt wurden. Dabei fielen 7.4 g einer relativ unpolaren Fraktion I und 6.7 g einer relativ polaren Fraktion II an, die den entsprechenden Fraktionen des Aetherextraktes (siehe dort) zugeschlagen wurden.

Der polare braune Rückstand wurde in Aether aufgenommen, wobei sich farblose Kristalle abschieden. Nach Umkristallisieren aus Aceton verblieben 850 mg reine Kristalle vom Schmelzpunkt 195-196°C und der Masse 374, die nach MS, IR und ^{1}H-NMR als Atranorin (24) identifiziert wurden.



(24)

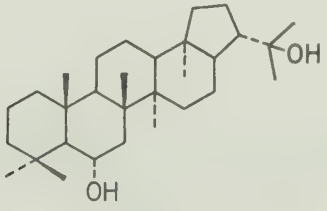
Da Atranorin als Flechteninhaltsstoff und Antibiotikum bekannt ist[44], wurden die verschiedenen, erkennbaren Flechtenarten, die sich auf einem dafür zurückbehaltenen Rindenstück fanden, massenspektroskopisch untersucht. Zwei zeigten die Masse und typischen Fragmente von Atranorin, besonders

stark jedoch nur eine Art, die als Parmelia trichotera identifizert wurde[45].

b) Aetherextrakt

Die bereits mit Petrolaether extrahierte Rinde wurde nun 36 Std. mit Aether nach dem Soxhlet-Verfahren extrahiert. Es wurden 111 g Extrakt erhalten. Dessen Zusammensetzung ähnelte der des von Atranorin befreiten aetherlöslichen Rückstandes aus der Petrolaetherextraktion (7.3 g). Daher wurden diese beiden Fraktionen vereinigt und über 2.2 kg Kieselgel mit Methylenchlorid/Aceton (8:2) grob aufgetrennt, wobei 62.2 g einer relativ unpolaren, terpenoidhaltigen Fraktion I und 28.6 g einer relativ polaren, terpenoidhaltigen Fraktion II erhalten wurden. Beide Fraktionen zeigten in einer Konzentration von 0.2 % in Methanol bereits eine deutliche Antifeeding-Aktivität. (Vergl. Kap. VII)

Um die Terpenoide von den etwa gleich polaren Phytosterolen zu trennen, wurde Fraktion I zunächst über 1.6 kg Kieselgel mit Benzol/Essigester (5:2) chromatographiert, wobei Fette, Wachse und die üblichen Phytosterole ß-Sitosterol, Campesterol und Stigmasterol, letztere identifiziert als Mischkristalle, Schmp. 134-135°C (aus Aceton), durch DC und MS, weitgehend entfernt wurden. Weiter wurden 670 mg eines Terpenoids mit der Masse 444, Schmp. 244-6°C (aus Aceton), isoliert, das durch hochaufgelöstes MS (m/e 444.39482 $\hat{=}$ $C_{30}H_{52}O_2$, R = 5), IR, ^{1}H- und ^{13}C-NMR als Zeorin (25) identifiziert wurde. Durch Vergleich der Spektren mit einer Originalprobe von (25)[46] wurde die Struktur bestätigt.



(25)

Zeorin ist nur als Flechteninhaltsstoff bekannt. Da die massenspektroskopisch untersuchten Flechten der Rinde von Toona ciliata keine Substanz der Masse 444 zeigten, muß angenommen werden, daß das Zeorin von einer nicht mehr sichtbaren Flechte an die Rinde abgegeben worden ist.

2.) Isolierung der Tetranortriterpenoide:

a) Isolierung von Toonacilin und 6-Acetoxytoonacilin.

Der verbleibende, Terpenoide enthaltende Anteil der Fraktion (22.5 g) wurde nun mit Methylenchlorid/Aceton (8:2, Umkehrung der R_f-Werte) auf 750 g Kieselgel chromatographiert, um den Rest des Phytosterolanteils vollends abzutrennen. Es wurden so 12.1 g eines neuen Terpenoids gewonnen, das noch durch Wachse verunreinigt war. Diese Substanz wurde in möglichst wenig warmem Methanol gelöst. Beim Abkühlen schieden sich die Wachse aus und wurden abzentrifugiert. Die verbliebene klare methanolische Lösung wurde auf 25 ml eingeengt und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Es schieden sich schöne Prismen aus (Schmp. 151-2°C), die als Mischkristalle zweier Substanzen erkannt wurden (Abb. 1). Aus der Mutterlauge kristallisierte eine der beiden Komponenten rein aus (Nadeln, Schmp. 118-9°C; α_D^{20} = + 69° ($CHCl_3$, C = 1)). Diese offenbar neue Verbindung mit der Masse 554 wurde Toonacilin (26) genannt.

Die Mischkristalle ließen sich durch praeparative Hochdruckflüssigkeitschromatographie auf einer 60 g LiChroprep Si 60, 15-25μ (Merck) enthaltenden Säule (N_{th} = 600/25 cm) mit Methylenchlorid/Essigester (9:1) trennen.

Die zweite Komponente kristallisierte aus Methanol in Prismen (Schmp. 215°C; α_D^{20} = +42.5° ($CHCl_3$, C = 1)). Sie wurde später als 6-Acetoxytoonacilin (27) identifiziert.

Nach zahlreichen weiteren Reinigungsoperationen wurde folgende Ausbeute an Reinsubstanzen erzielt: 7.32 g (26), 0.35 g (27), 0.43 g 1:1 Mischkristalle.

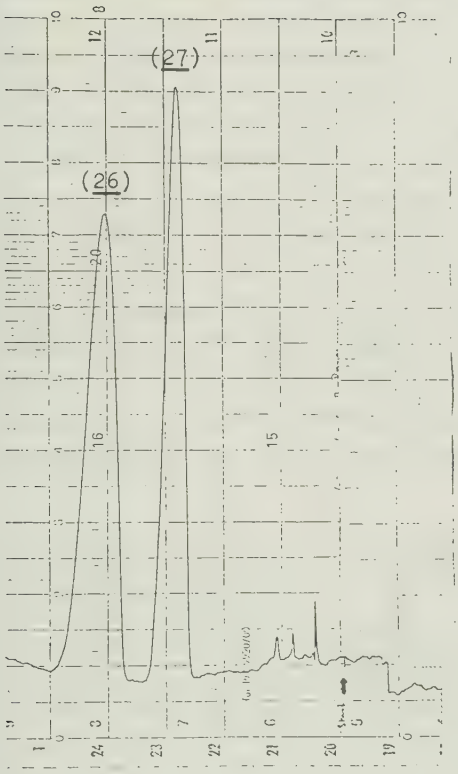


Abb.1:
HPLC der Mischkristalle aus (26) und (27).
Säule: 250 x 4 mm, gepackt mit LiChrosorb Si 100, 10µ
Fließmittel: Methylenchlorid/Essigester (9:1)
Durchfluß: 4.25 ml/Min.
Druck: 80 bar
Detektion: UV, 263 nm

b) Isolierung von 23- und 21-Hydroxytoonacilid

Aus dem Aetherextrakt sind wie beschrieben 28.6 g einer relativ polaren, terpenoidhaltigen Fraktion II erhalten worden. Bei der Aufarbeitung der relativ unpolaren Fraktion I zu den Toonacilinen fielen weitere 15.6 g polare Fraktionen an, die mit Fraktion II vereinigt wurden.

Diese Substanz enthielt zwei Hauptkomponenten, die in mehreren Arbeitsgängen auf Kieselgel 60-Säulen (Substanz: SiO_2 = 1:50) mit Essigester/Petrolaether 30-50°C (8:2) getrennt wurden. Beide Komponenten waren danach noch durch zäh anhaftende Lipide

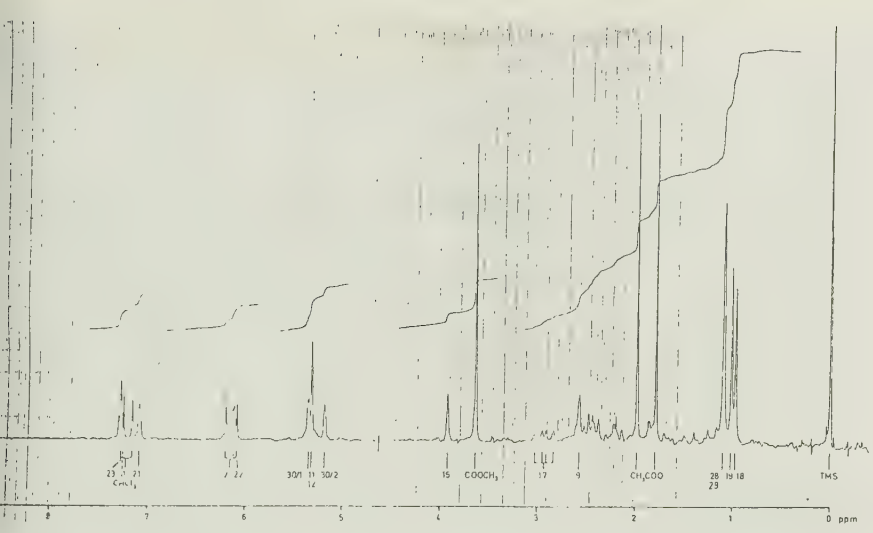
ähnlicher Polarität verunreinigt, die durch Chromatographie auf Kieselgel mit Essigester/Petrolaether 30-50° (2:8) und anschließend durch praep. HPLC auf LiChroprep RP-8 (25-40µ, E. Merck, Darmstadt) mit Methanol/Wasser 3:1 abgetrennt wurden. Die so gereinigten Komponenten fielen als harte, farblose Schäume an. Sie bekamen aufgrund ihrer γ-Hydroxybutenolidstrukturen die Bezeichnungen 23-Hydroxytoonacilid (28) (15.3 g) und 21-Hydroxytoonacilid (29) (6.8 g).

3.) Strukturaufklärung von Toonacilin (26)

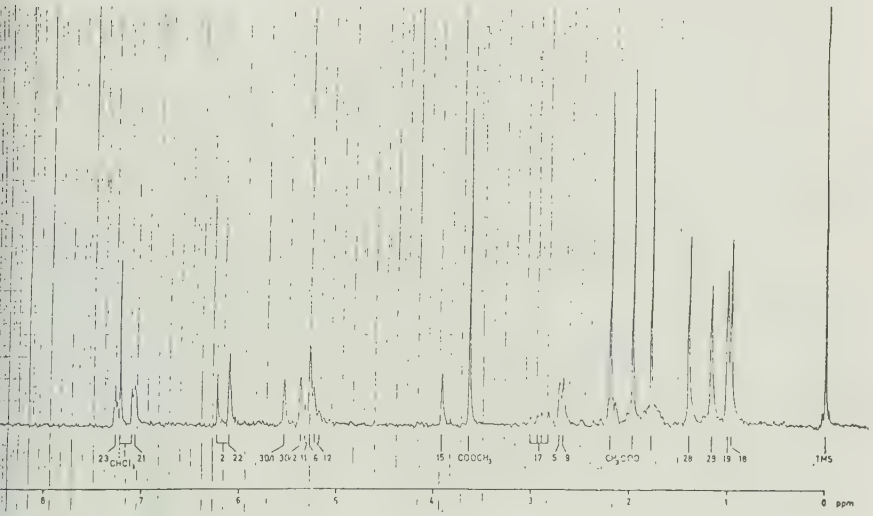
a) Die Hochauflösung des M^+-Peaks ergab die Masse m/e = 554.25097. Daraus folgte die Summenformel $C_{31}H_{38}O_9$ (berechnete Masse 554.25159) mit dem R-Wert 13.

b) Die Elementaranalyse ergab 66.50 % C (ber. 67.13 %) und 6.86 % H (ber. 6.91 %) und zeigte damit eine hinreichende Reinheit der Substanz.

c) Das 90 MHz - ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb. 2, $CDCl_3$, δ (ppm) bezogen auf TMS = 0): Das Spektrum zeigte 4 anguläre Methylgruppen (0.97, 3H; 1.01, 3H; 1.09, 6H), 2 Acetoxygruppen (1.79 und 1.99, je 3H), eine Methylestergruppe (3.65, 3H), eine exo-Methylengruppe (5.21 und 5.39, d, je 1H, J_{gem} = 1.0 Hz), ein isoliertes 6-Ring-Enon-System (6.18 und 7.24, d, je 1H, J_{AB}= 10.4 Hz) und einen Furanrest (6.16, 7.12 und 7.31, m, je 1H). Aus den Signalen bei 5.34 und 5.36, d, je 1H, (J_{AB} = 4.3 Hz) ging hervor, daß die beiden Acetoxygruppen an sekundäre C-Atome gebunden und benachbart sein mußten. Das breite Singulett bei 3.94 (1H) deutete auf eine Aetherfunktion hin. Da sich das Spektrum bei Zugabe von D_2O nicht änderte, kann die Existenz einer Hydroxylgruppe ausgeschlossen werden. Das doppelte Dublett bei 2.94 (1H) konnte evt. einer -CH-Furan-Gruppe zugeordnet werden, die mit zwei weiteren Protonen koppelt. Die bisher gefundenen Daten deuten auf ein hochoxidiertes Terpenoid hin. Alle Sauerstoff-Funktionen sind zugeordnet Da 2 Acetoxygruppen und eine Methylestergruppe zusammen 5 C-Atome erfordern, bleiben für das Gerüst noch 26 C-Atome. Es ist anzunehmen, daß die beiden der exo-Methylengruppe zuge-

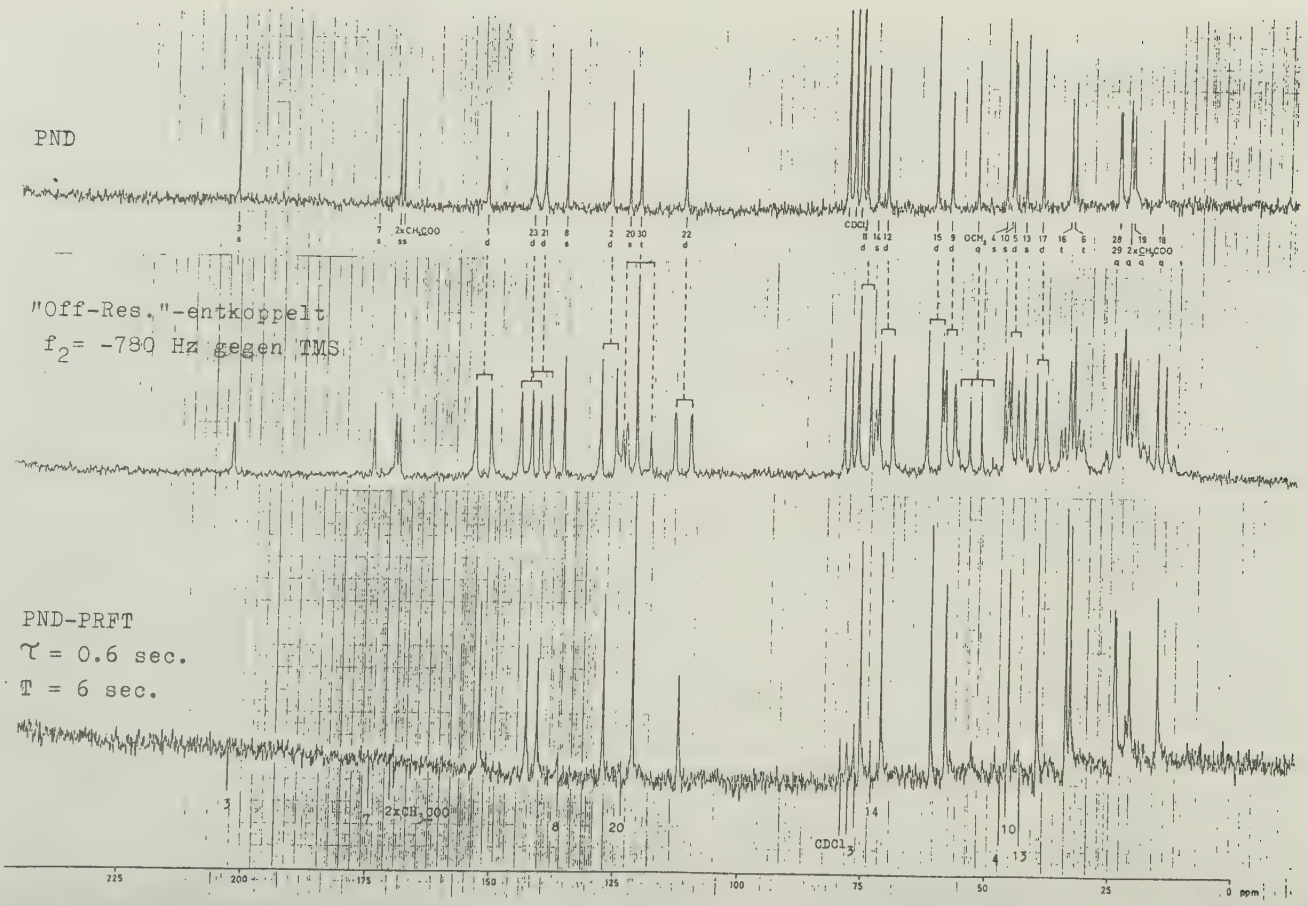


oonacilin



Acetoxytoonacilin

Abb. 2: ^{1}H-NMR-Spektren der Toonacilire, 60 MHz-Aufnahmen in $CDCl_3$.

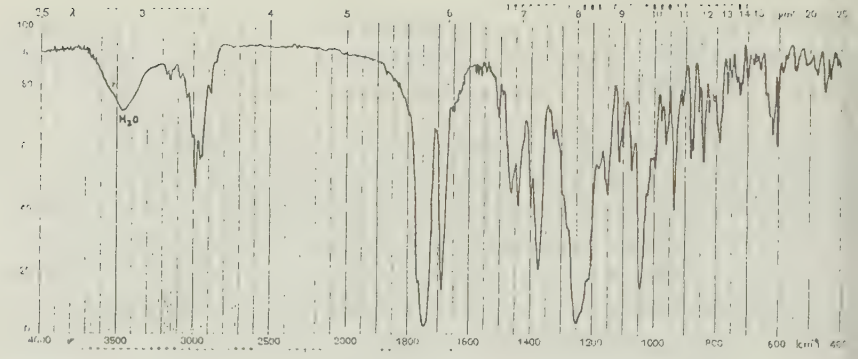

PND
"Off-Res."-entkoppelt
f_2 = -780 Hz gegen TMS
PND-PRFT
τ = 0.6 sec.
T = 6 sec.
CDCl3
2xCH3COO
225
200
175
150
125
100
75
50
25
0 ppm

hörigen C-Atome aus dem Gerüst stammen. Damit ist für Toonacilin eine seco-Tetranortriterpenoidstruktur anzunehmen, wie sie in der Familie der Meliaceen häufig vorkommt.

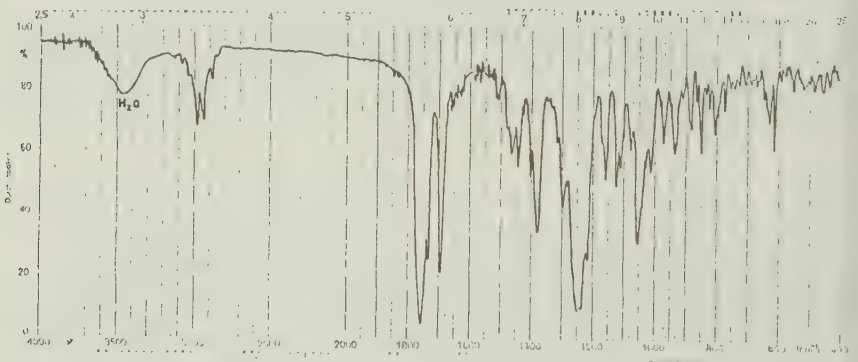
d) Das PND-^{13}C-NMR-Spektrum (Abb. 3, $CDCl_3$, δ (ppm) bezogen auf TMS = 0) Das Spektrum zeigt alle 31 C-Atome aufgelöst. Man erkennt deutlich abgesetzte Gruppen, die auf Grund ihrer chemischen Verschiebung wie folgt zugeordnet werden können: Bei 202.5 findet man die Oxogruppe des Enonsystems. Die drei Signale zwischen 168.9 und 174.0 sind Estercarbonylen zuzuordnen. Im Bereich zwischen 111.5 und 151.8 sind die C-Atome des Furanrings, der Exomethylengruppe, sowie die olefinischen C-Atome des Enonsystems zu finden. Im Bereich zwischen 70.3 und 74.6 liegen drei C-Atome, die Sauerstoff-Funktionen tragen. Die Signale der Methylgruppen des Gerüsts und die zwei Signale der Acetoxygruppen liegen in einer sauber abgesetzten Gruppe zwischen 14.3 und 23.0.

Mit der PND - PR - FT - Methode[47] kann man unter geeigneten Aufnahmebedingungen alle C-Atome identifizieren, die keine H-Atome tragen. Diese erscheinen auf Grund ihrer längeren Relaxationszeiten als negative Peaks. Im Spektrum des Toonacilins treten nur drei C-Atome auf (41.9, 44.7, 46.0), die jeweils mit 4 weiteren C-Atomen verbunden sind, sowie eine $-\overset{|}{\underset{|}{C}}-O-$Funktion bei 72.4. Im "Off-Resonance" entkoppelten ^{13}C-NMR-Spektrum erhält man dieselbe Information, da solche C-Atome Singuletts bleiben, während die übrigen entsprechend ihrer H-Substitution Multipletts bilden. Allerdings überlappen die Singuletts oft mit den Multipletts, so daß sie im "Off-Resonance"-Spektrum schlechter erkennbar sind. Sofort erkennbar auf Grund ihrer Multiplizität und chemischen Verschiebung sind die CH_3-Gruppe des Methylesters (q, 51.9) und die $=CH_2$-Gruppe (t, 120.7).

e) Das IR-Spektrum (KBr, cm^{-1}) (Abb. 4) bestätigt die Existenz eines Furanrestes (3165, 3145, 1504, 881), einer Exomethylengruppe (3082, 874), eines α,β-ungesättigten 6-Ring-Ketons (3037, 1688) sowie der Estercarbonyle (1766, 1745).



Toonacilin

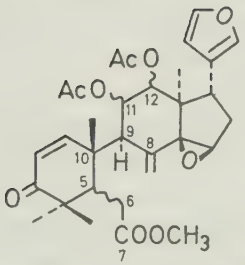


6-Acetoxytoonacilin

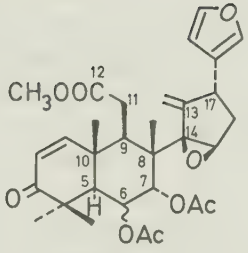
Abb. 4: IR-Spektren (KBr) der Toonaciline.

f) Die Konstitution von Toonacilin

Mit der Annahme der Biogenese durch oxidative Ringöffnung eines 14,15-Epoxymeliacangerüsts[48] (Cedrelon oder ein Vorläufer davon) konnten lediglich die zwei alternativen Strukturen I und II aufgestellt werden, die alle bereits gefundenen Strukturelemente enthielten:



I



II

Zwei Argumente sprechen für I und gegen II:

1.) Der Basispeak im Massenspektrum von Toonacilin hat die Masse m/e = 209. Diese Masse entspricht dem Ring-A-Fragment, das durch Bruch der Bindung C^9-C^{10} entsteht. Das einer solchen Spaltung entsprechende Ring-D-Fragment, das durch Bruch der Bindung C^8-C^{14} bei Struktur II entstünde, hätte nur die Masse 161. Diese wurde im MS nicht gefunden.

2.) Das ^{1}H-NMR-Signal für H^{17} (δ=2.94ppm) müßte im Vergleich zu H^{17} bei Cedrelon (δ=2.77ppm) wesentlich weiter nach tiefem Feld verschoben sein (δ = ca. 3.7 ppm, wie z.B. bei Nimbin (17)[30] oder Salannin[49]) wenn Struktur II zuträfe, da die exo-Methylengruppe dann zu C^{17} benachbart wäre. Dies ist offensichtlich nicht der Fall.

g) Die Konfiguration an C^9, C^{11}, C^{12} und C^{13}

Geht man davon aus, daß die Struktur von Toonacilin aus einem Apo-euphan-Skelett mit nachfolgender, oxidativer Öffnung des Ringes B hervorgegangen ist, so sollte die Konfiguration an C^9 und C^{13} (H^9 und $CH_3{}^{19}$ unverändert erhalten geblieben sein. Zu bestimmen war also die Stellung der beiden Acetoxygruppen an C^{11} und C^{12} auf Grund der Kopplungskonstanten im ^{1}H-NMR-Spektrum.

Die Kopplungskonstante $^3J_{H^9/H^{11}}$ ist ungefähr null. Daraus folgt, daß H^9 und H^{11} einen Torsionswinkel α von etwa + 90° einschließen, d.h. daß sie trans (e,e) stehen und daß der

Ring C in einer Sesselkonformation vorliegen muß. (Im Falle der Wannenkonformation stünden H^9 und H^{11} trans (a,a) zueinander, was mit $^3J_{H^9/H^{11}}$ nicht vereinbar ist.)

Da H^{11} aequatorial steht, gibt es für die relative Konfiguration zwischen H^{11} und H^{12} die beiden Möglichkeiten cis (e,a) oder trans (e,e). Im Falle einer echten Sessel-Konformation wäre der Torsionswinkel ß zwischen den beiden H-Atomen $+60^\circ$ bzw. -60°, d.h. man könnte sie auf Grund der Kopplungskonstanten nicht unterscheiden. Die Sesselkonformation muß aber wegen der exo-Methylengruppe und des angrenzenden epoxidierten Fünfringes abgeflacht sein. Im Falle der cis (e,a) Konfiguration muß sich der Betrag für ß dann verkleinern, im anderen Falle vergrößern. Nimmt man für ß eine Änderung von nur $\pm 10^\circ$ an, so bedeutet das nach der Kurvenschar der Karplus-Gleichung[50] für die cis (e,a) Konfiguration ($ß=+50^\circ$) einen Bereich für $^3J_{H^{11}/H^{12}}$ von 2.2 bis 6 Hz, im Falle der trans (e,e) Konfiguration ($ß=70^\circ$) von 0.3 bis 1.5 Hz. (Die Elektronegativität der Substituenten ist dabei nicht berücksichtigt). Bei (26) beträgt $^3J_{H^{11}/H^{12}}$ 4.3 Hz, daher wird der cis (e,a) Konfiguration für H^{11} und H^{12} der Vorzug gegeben. Daraus folgt, beide Acetoxygruppen sind α-ständig in der üblichen Projektion. Sie nehmen eine vicinale cis (a,e) Konfiguration ein. Der Vergleich mit (27), wo die Konfiguration durch Röntgenstrukturanalyse abgesichert ist (s.S.50), bestätigt diese Annahme. Bei (27) ist $^3J_{H^{11}/H^{12}} = 4.4$ Hz, $\alpha = +89^\circ$, $ß = +49.2^\circ$; H^{11} und H^{12} stehen dort cis (e,a).

h) Die Konfiguration an C^{14}, C^{15} und C^{17}

Es ist bekannt, daß die chem. Verschiebung von H^{15} durch dessen relative Orientierung zum Substituenten an C^7 stark beeinflußt wird[51]. Da $\delta_{H^{15}}$ bei Toonacilin und 6-Acetoxytoonacilin fast gleich ist (3.94 und 3.95) kann die ß-Orientierung der 14,15-Epoxygruppe, wie sie für 6-Acetoxytoonacilin durch Röntgenstrukturanalyse gefunden worden ist, für Toonacilin übernommen werden.

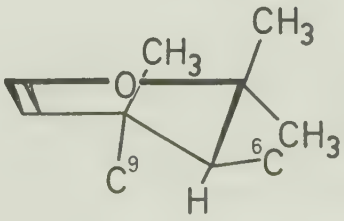
Mit ähnlichen Argumenten kann die α-Orientierung des Furanrestes an C^{17} bestimmt werden. Hier wäre eine starke Tieffeldverschiebung der Me^{18}-Gruppe bei Umkehrung der Konfiguration an C^{17} im Vergleich mit 6-Acetoxytoonacilin zu erwarten[52]. Dies ist nicht der Fall. Für beide Verbindungen ist $\delta_{Me^{18}} = 0.97$.

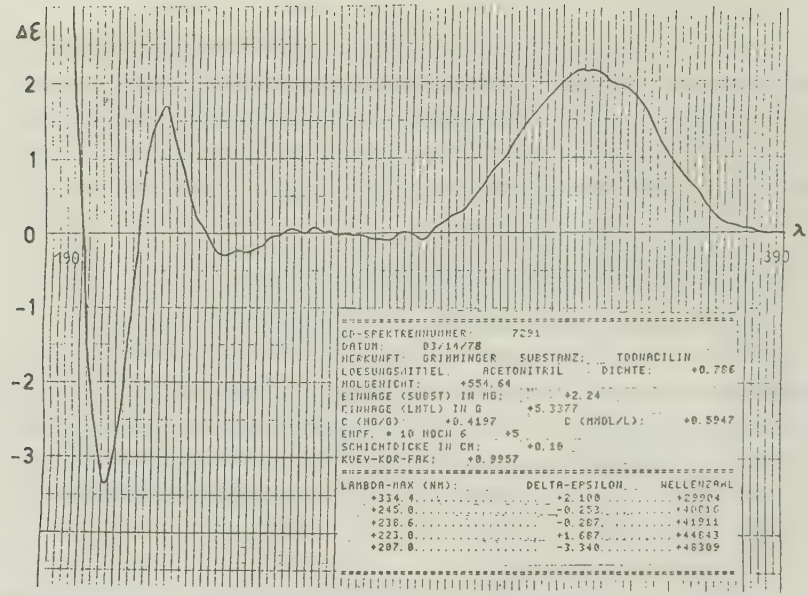
i) Konfiguration und Konformation des Ringes A:

Die Konfiguration an C^5 und C^{10} ist die des Epoxymeliacangerüsts, d.h. die Seitenkette an C^5 steht ß-äquatorial, die Methylgruppe an C^{10} steht ß-axial. Das durfte nicht von vornherein so angenommen werden, denn wäre Cedrelon (13) ein Vorläufer in der Biogenese von Toonacilin, so hätte bei der Hydrierung der C^5-C^6-Doppelbindung eine Konfigurationsumkehr erfolgen können.

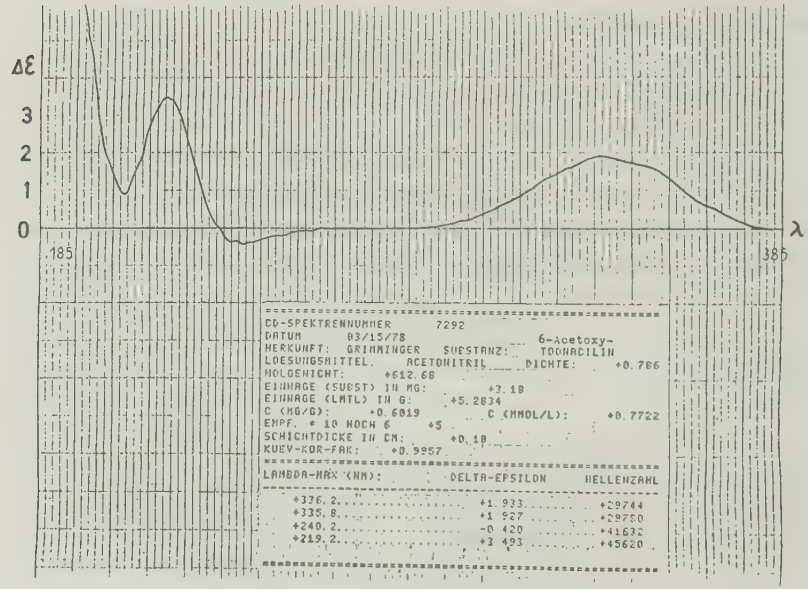
Als Beweis für die Zuordnung von Konfiguration und Konformation dient das CD-Spektrum im Vergleich mit dem von 6-Acetoxytoonacilin (Abb.6)[53], bei dem die Stereochemie durch die Röntgenstrukturanalyse gesichert ist. In beiden CD-Spektren beobachtet man für die R-Bande, d.h. für den $n \rightarrow \pi^*$-Übergang des α, ß-ungesättigten 6-Ringketons, einen positiven Cotton-Effekt und zwar $\Delta\varepsilon = +2.1$ für Toonacilin und $\Delta\varepsilon = +1.9$ für 6-Acetoxytoonacilin. Daraus folgt nach den Regeln von SNATZKE[54] für beide Verbindungen, daß der Ring A eine Anordnung wie in Abb. 5 haben muß. Das heißt, der Torsionswinkel zwischen der Carbonylgruppe und der Doppelbindung muß negativ sein.

Abb. 5: Projektion des Ringes A von der Carbonylgruppe aus gesehen.





Toonacilin



6-Acetoxytoonacilin

Abb. 6: CD -Spektren der Toonaciline.

Für 6-Acetoxytoonacilin findet man aus der Röntgenstrukturanalyse einen Torsionswinkel von -164.2°. Bei bisher veröffentlichten CD-Spektren von Meliacanstrukturen mit einem Δ^1-En-3-on-system im Ring A wie z.B. bei Azadiron (12) oder Gedunin (14)[51] wurde ein negativer Cottoneffekt entsprechend einem positiven Torsionswinkel gefunden. Letzterer ist ebenfalls durch Röntgenstrukturanalyse abgesichert[27b].

Der hiervon abweichende Torsionswinkel des Enonsystems bei 6-Acetoxytoonacilin und Toonacilin kann nur von der durch die Ring-B-Spaltung entstandenen C^5-Seitenkette hervorgerufen werden. Da sich die CD-Spektren beider Verbindungen gleichen, (Abb. 6) kann daraus geschlossen werden, daß auch die Konformation des Ringes A und die Konfiguration an C^5 und C^{10} bei beiden Verbindungen gleich sein muß.

k) Die ^{1}H-NMR-chemische Verschiebung der angulären Methylgruppen

Es sind 4 anguläre Methylgruppen zuzuordnen. Die δ-Werte stimmen sehr gut mit denen von Andirobin (16)[29] überein. Leider sind die δ-Werte dort nicht den entsprechenden Methylgruppen zugeordnet worden. Die Methylsignale wurden durch Vergleich der δ-Werte (Tabelle 3) der vier verwandten Verbindungen Toonacilin (26), 6-Acetoxytoonacilin (27), 23-Hydroxytoonacilid (28) und 23-Acetoxytoonacilid (30) zugeordnet.

Vergleicht man (26) mit (30) so tritt nur bei einer Methylgruppe eine Änderung von $\Delta\delta$ = 0.01 ppm auf. Strahlt man auf diese Gruppe ein, so wird das Dublett von H^{12} schärfer. Dieser Methylgruppe (δ = 0.97 ppm) wurde die Position 13 zugeordnet.

Vergleicht man (26) mit (27), so sieht man bei letzterem für eine Methylgruppe eine Tieffeldverschiebung von 0.30 ppm, bei einer zweiten von 0.08 ppm und bei einer dritten von 0.01 ppm. Die 13-Methylgruppe bleibt unverändert. Auf Grund der räumlich günstigsten Anordnung der $-CH_2-COOCH_3$-Seitengruppe an C^5

sollte bei Einführung der 6-Acetoxygruppe 4α-Methyl stark, 4ß-Methyl weniger stark und 10ß-Methyl nur schwach beeinflußt werden. Diese Gruppen wurden so den entsprechenden chemischen Verschiebungen zugeordnet.

Tabelle 3: Vergleich der ^{1}H-chem. Verschiebung der angulären Methylgruppen der neuen B-seco-Tetranortriterpenoide mit Andirobin (16) (δ ppm, $CDCl_3$)

Pos. der CH_3-Gruppe	4α	4 ß	10 ß	13α
Verbindung				
(16)[+)]	1.12	1.12	0.99	0.95
(26)	1.09	1.09	1.01	0.97
(27)	1.39	1.17	1.00	0.97
(28)	1.07	1.07	0.99	0.97
(30)	1.08	1.08	1.00	1.00

[+)] Die Zuordnung der Signale von (16) wurde nachträglich durch Vergleich mit (26) getroffen.

Strahlt man bei 6-Acetoxytoonacilin die Frequenz von H^5 oder H^9 ein, so wird jeweils das Signal der 10ß-Methylgruppe im Vergleich zur ebenfalls axial trans stehenden 4ß-Methylgruppe durch Longrange-Entkopplung schärfer. Das ist nur so zu erklären, daß 6-Acetoxytoonacilin in Lösung eine ähnliche Konformation wie im Kristall einnimmt, so daß H^9 zu 10ß-CH_3 eine transoide Position einnimmt, womit sich der Longrange-Entkopplungseffekt von H^5 und H^9 im Falle von 10ß-CH_3 addiert.

1) Die ^{1}H-NMR-chemische Verschiebung der im Methylenbereich liegenden Protonen H^5, H^6, H^9 und H^{16}, sowie der dicht beisammenliegenden Protonen H^{11}, H^{12} und H^{30}.

Für die einwandfreie Zuordnung dieser Protonen reichte die Auflösung des 90 MHz-NMR-Spektrums nicht aus. Daher wurde ein 360 MHz-NMR-Spektrum aufgenommen[55)] (Abb. 7 u. 8).

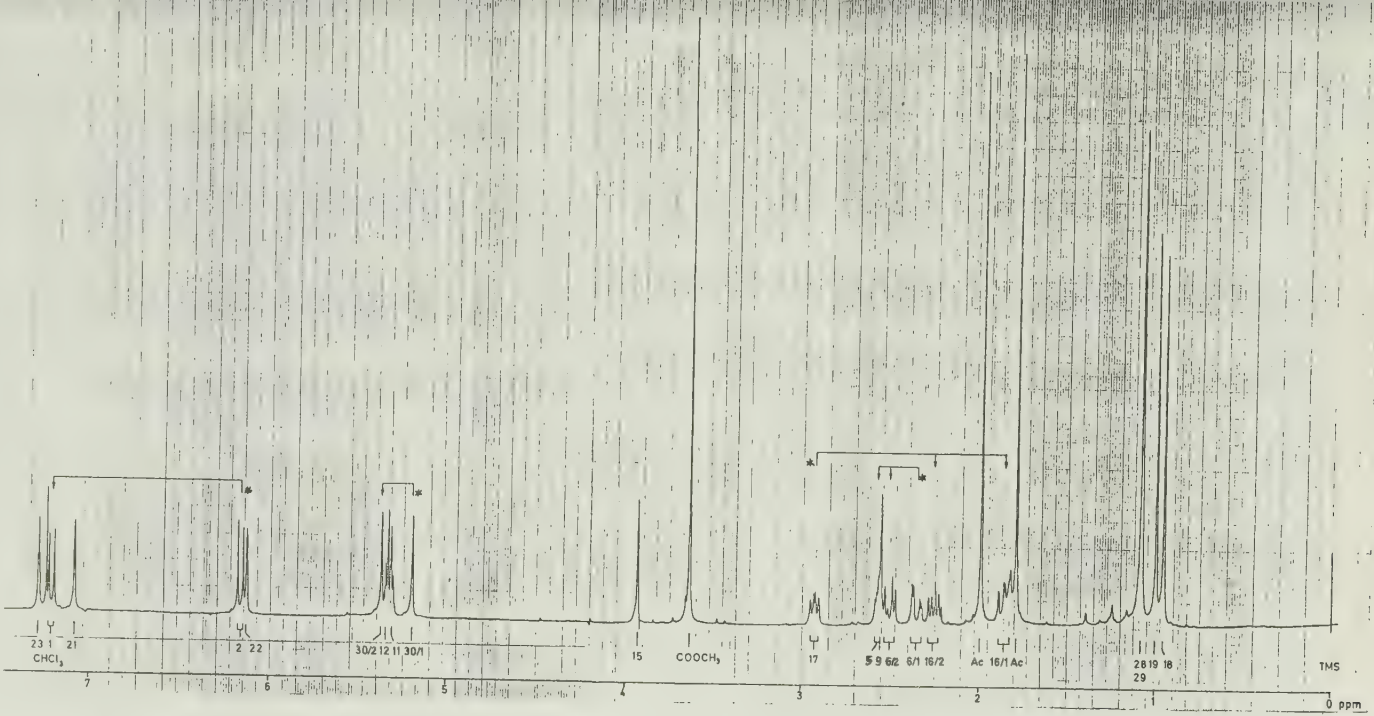


Abb. 7: ^{1}H-NMR-Spektrum von Toonacilin.360 MHz - Aufnahme in $CDCl_3$.
Die Einstrahlpunkte der Entkopplungsexperimente sind mit einem * gekennzeichnet.

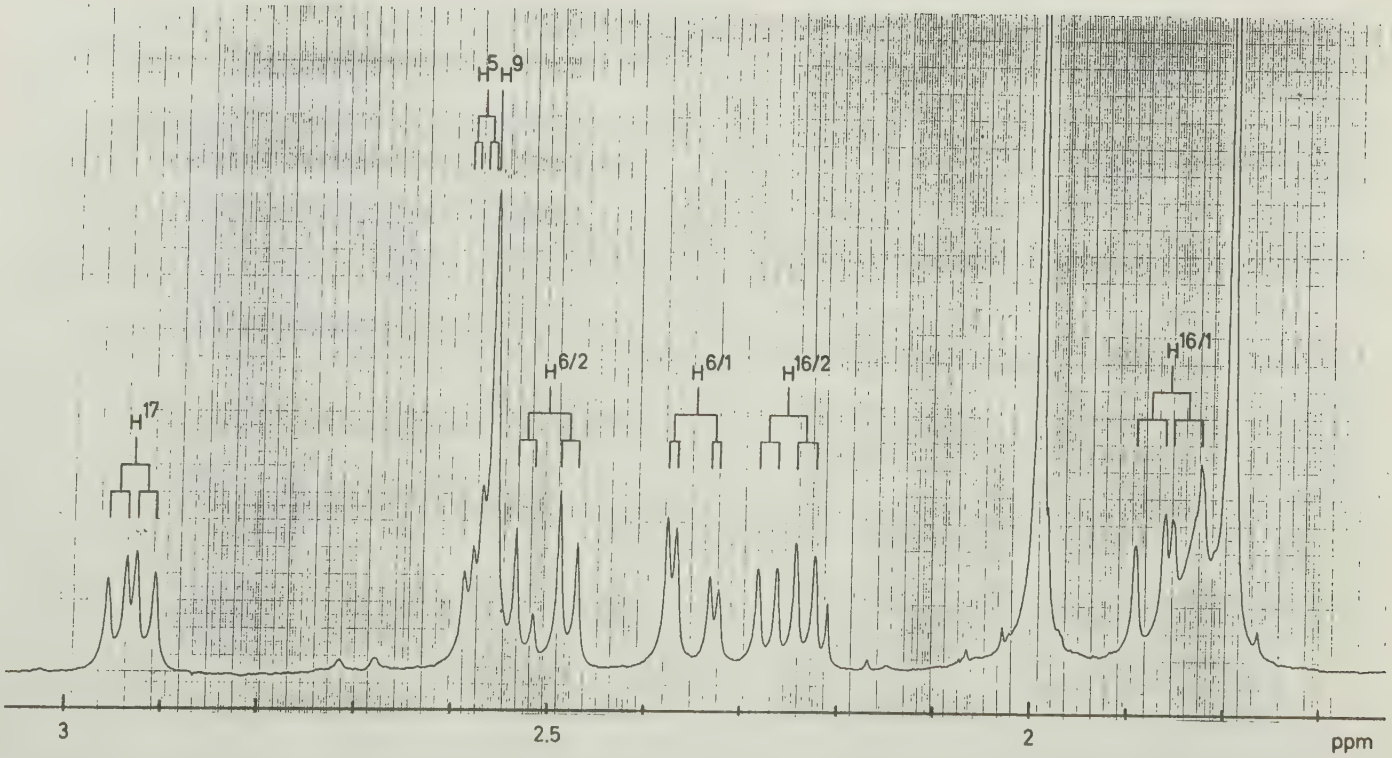


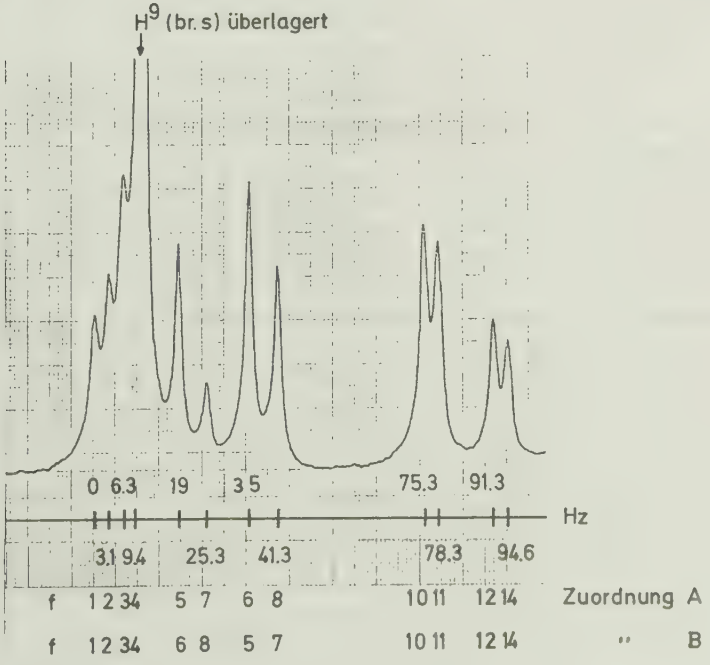
Abb. 8: ^{1}H-NMR-Spektrum von Toonacilin. 360-MHz-Aufnahme in $CDCl_3$, ppm-Werte bez. auf TMS = 0.
Spreizung des Methylerbereichs

) Das AMX-System CH_2^{16}, H^{17}:

as Quartett bei δ = 2.94 ppm wurde auf Grund der Regeln für ie chem. Verschiebung H^{17} zugeordnet. Strahlt man bei H^{17} ein, o werden die Multipletts der Furanprotonen schärfer struk- uriert, da die Longrange-Kopplung zu diesen Protonen zu- ammenbricht. Die beiden Quartetts bei δ = 1.87 und 2.27 ppm erwandeln sich in Dubletts mit einer gemeinsamen, geminalen opplungskonstante von ^2J =-13.7 Hz. Bei einem Abstand der eiden Signale von 144 Hz konnte das AMX-System nach den Re- eln 1. Ordnung ausgewertet werden. Die beiden vicinalen opplungskonstanten zwischen H^{17} und CH_2^{16} wurden so zu ^3J = .0 und 10.5 Hz bestimmt. Es gibt praktisch keine Kopplung wischen CH_2^{16} und H^{15}. Eine solche ist bisher auch bei ande- en Epoxymeliacan-Verbindungen nicht beobachtet worden[51)56)57)].

) Das ABX-System H^5, H^6 (Abb. 9):

bb. 9:



Die beiden Methylenprotonen in Position 6 sind diastereotop. Sie bilden mit H^5 ein ABX-System, dessen Bestandteile durch Entkopplungsexperimente idenfiziert werden konnten. Die Zuordnung der δ - und J-Werte zu den betreffenden Protonen wurde wie folgt berechnet[58].

In Abb. 9 ist links der AB- und rechts der X-Teil des ABX-Systems zu erkennen. Der AB-Teil wird vom H^9-Singulett überlagert. Der X-Teil ist nicht mehr symmetrisch. Das heißt, auf Grund der kleinen Distanz des X-Teils zum AB-Teil ist das System bereits auf dem Übergang zu einem ABC-System. Aus diesen Gründen können die Signalintensitäten nicht zur Zuordnung der AB-Teilspektren benutzt werden. Es sind daher 2 Zuordnungsmöglichkeiten A und B zu berücksichtigen, für die auf Grund der Unbestimmtheit des Vorzeichens der Quadratwurzeln jeweils 2 Lösungen zu erwarten sind.

Berechnung der Zuordnung A:

Bestimmung der Zentren Z der beiden AB-Teilspektren:

$Z_I = 1/2\ (f_3+f_5) = 1/2\ (6.3+19.0) = 12.7$ Hz

$Z_{II} = 1/2\ (f_4+f_6) = 1/2\ (9.4+35.0) = 22.2$ Hz

Bestimmung der relativen chemischen Verschiebung $[\nu_o \delta]$ der beiden Teile:

$[\nu_o \delta]_I = \sqrt{(f_5-f_3)\ (f_7-f_1)} = \sqrt{12.7 \cdot 25.3} = \pm 17.93$ Hz

$[\nu_o \delta]_{II} = \sqrt{(f_6-f_4)\ (f_8-f_2)} = \sqrt{24.7 \cdot 38.2} = \pm 30.72$ Hz

Bestimmung der effektiven Larmorfrequenzen ν^*:

$\nu^*_{a_I} = Z_I - 1/2\,[\nu_o \delta]_I = 3.69$ Hz

$\nu^*_{b_I} = Z_I + 1/2\,[\nu_o \delta]_I = 21.61$ Hz

$\nu^*_{a_{II}} = Z_{II} - 1/2\,[\nu_o \delta]_{II} = 6.84$ Hz

$\nu^*_{b_{II}} = Z_{II} + 1/2\,[\nu_o \delta]_{II} = 37.56$ Hz

Bestimmung der Kopplungskonstanten J_{AX} und J_{BX}:

1. Lösung:

$J_{AX} = \nu^*_{a\,II} - \nu^*_{a\,I} = 3.15$ Hz

$J_{BX} = \nu^*_{b\,II} - \nu^*_{b\,I} = 15.95$ Hz

2. Lösung:

$J_{AX} = \nu^*_{b\,II} - \nu^*_{a\,I} = 33.87$ Hz

$J_{BX} = \nu^*_{a\,II} - \nu^*_{b\,I} = -14.77$ Hz

Berechnung der Zuordnung B:

$Z_1 = 1/2\ (6.3+35) = 20.65$ Hz

$Z_2 = 1/2\ (9.4+19) = 14.20$ Hz

$[\nu_0 \delta]_I = \sqrt{28.7 \cdot 41.3} = 34.43$ Hz

$[\nu_0 \delta]_{II} = \sqrt{9.6 \cdot 22.2} = 14.60$ Hz

$\nu^*_{a_I} = 20.65 - 17.22 = 3.43$ Hz

$\nu^*_{b_I} = 20.65 + 17.22 = 37.87$ Hz

$\nu^*_{a_{II}} = 14.20 - 7.30 = 6.90$ Hz

$\nu^*_{b_{II}} = 14.20 + 7.30 = 21.50$ Hz

1. Lösung:

$J_{AX} = 6.90 - 3.43 = 3.47$ Hz

$J_{BX} = 21.50 - 37.87 = -16.37$ Hz

2. Lösung:

$J_{AX} = 21.5 - 3.43 = 18.07$ Hz

$J_{BX} = 6.9 - 37.87 = -30.97$ Hz

Auswahl der richtigen Lösung:

Die jeweils zweiten Lösungen der Zuordnungen A und B scheiden wegen des Auftretens zu großer Kopplungskonstanten aus. Für eine Methylengruppe, die einer Carbonylgruppe benachbart ist, sollte man für $^2J_{gem} \approx -15$ Hz erwarten. Das heißt, die dem Spektrum entnommene Kopplungskonstante $J_{AB} = 6.3$ Hz kann nicht $^2J_{gem}$ sein. Also müssen J_{AX} und J_{BX} verschiedene Vorzeichen haben, da die vicinalen Kopplungen praktisch immer positiv sind. Dies ist nur in der 1. Lösung der Zuordnung B der Fall, die somit als die Richtige erkannt ist.

Bestimmung der relativen chemischen Verschiebungen ν_A und ν_B bezogen auf $f_1 = 0$Hz :

$\nu_A = \nu^*_{a_I} + 1/2\ J_{AX} = 3.43 + 1.74 = 5.17$ Hz

$\nu_B = \nu^*_{b_I} + 1/2\ J_{BX} = 37.87 - 8.19 = 29.68$ Hz

$\nu_X = 84.95$ Hz (dem Spektrum entnommen)

Abstand der relativen chemischen Verschiebungen von ν_H17:

$f_1 = 123.2$ Hz

$\nu_A = 128.4$ Hz $\hat{=}$ 0.357 ppm

$\nu_B = 152.9$ Hz $\hat{=}$ 0.425 ppm

$\nu_X = 208.15$ Hz $\hat{=}$ 0.578 ppm

Mit $\delta_H17 = 2.944$ ppm bez. auf TMS = 0 werden die chem. Verschiebungen wie folgt auf TMS bezogen:

$\delta_{H_A} = 2.944 - 0.357 = 2.587$ ppm

$\delta_{H_B} = 2.944 - 0.425 = 2.519$ ppm

$\delta_{H_X} = 2.944 - 0.578 = 2.366$ ppm

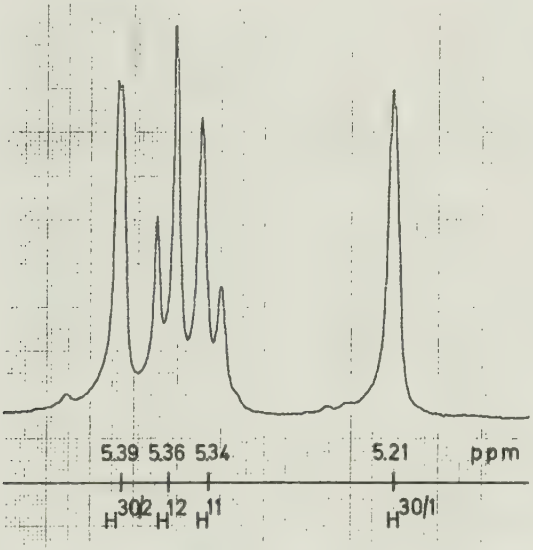
Da H_B und H_X durch die geminale Kopplung verbunden sind, müssen diese die beiden H^6-Protonen sein, H_A ist folglich H^5.

Zusammenfassend wurden folgende Daten erhalten:

$\delta_{H}5$ = 2.59 ppm, $\delta_{H}6$ = 2.52 und 2.37 ppm; J_{vic} = 3.5 und 6.3 Hz, J_{gem} = -16.4 Hz.

c) Die AB-Systeme H^{11}, H^{12} und $H^{30/1}$u.2 (Abb. 10)

Abb. 10:



Für die exo-Methylenprotonen (Position 30) wird eine geminale Kopplungskonstante $^{2}J \leq 2.5$ Hz erwartet[58]. Damit können die Dubletts (^{2}J = 1 Hz) bei 5.21 und 5.39 ppm den beiden Protonen an C^{30} zugeordnet werden. Folglich gehören die AB-Dubletts bei 5.34 und 5.36 ppm (^{3}J = 4.3 Hz) zu H^{11} und H^{12}. Strahlt man auf das breite Singulett von H^{9} bei 2.58 ppm ein, so wird die vorher kaum sichtbare Aufspaltung von $H^{30/1}$ bei 5.21 ppm schärfer, außerdem wird das Dublett bei 5.34 ppm schlanker und höher, so daß dieses Signal H^{11} zugeordnet werden kann. Die Kopplungskonstante zwischen H^{9} und H^{11} bzw. zwischen H^{9} und H^{30} ist fast null (vergl.3 g).

Damit sind die Protonen zugeordnet. Die Daten sind in Tabelle4 zusammengefaßt.

Tabelle 4: ^{1}H-NMR-Daten von Toonacilin (26) und 6-Acetoxytoonacilin (27) (δ-Werte in ppm bez. auf TMS = 0 , Kopplungskonstanten in Hz, Lösungsmittel: $CDCl_3$).

H-Atom	(26)[a]	(27)[b]
1	7.24 d, J = 10.4	7.20 d, J = 10.7
2	6.18 d, J = 10.4	6.20 d, J = 10.7
5	2.59 ABX, $J_{vic.}$= 6.3 u. 3.5	2.72 br.s
6/1	2.37 ABX, $J_{gem.}$=-16.4, $J_{vic.}$=3.5	
6/2	2.52 ABX, $J_{gem.}$=-16.4, $J_{vic.}$=6.3	5.31 br.s
9	2.58 br.s	2.69 br.s
11	5.34 d, J = 4.3	5.33 d, J = 4.4
12	5.36 d, J = 4.3	5.25 d, J = 4.4
15	3.94 s	3.95 s
16/1	1.87 AMX, $J_{gem.}$=-13.7, $J_{vic.}$=10.5	1.84 AMX, $J_{gem.}$=-13.8, $J_{vic.}$=10.8
16/2	2.27 AMX, $J_{gem.}$=-13.7, $J_{vic.}$= 7.0	2.26 AMX, $J_{gem.}$=-13.8, $J_{vic.}$= 6.7
17	2.94 AMX, $J_{vic.}$= 7.0 und 10.5	2.94 AMX, J = 10.8 u. 6.7
18	0.97 s	0.97 s
19	1.01 s	1.00 s
21	7.12 m	7.12 m
22	6.16 m	6.15 m
23	7.31 m	7.31 m
28	1.09 s	1.39 s
29	1.09 s	1.17 s
30/1	5.21 d, $J_{gem.}$= 1.0	5.41 br.s
30/2	5.39 d, $J_{gem.}$= 1.0	5.58 br.s
O-CH_3	3.65 s	3.67 s
O-Ac	1.79 s	1.79 s
O-Ac	1.99 s	1.99 s
O-Ac	-	2.21 s

a) 360 MHz-Aufnahme
b) 90 MHz-Aufnahme

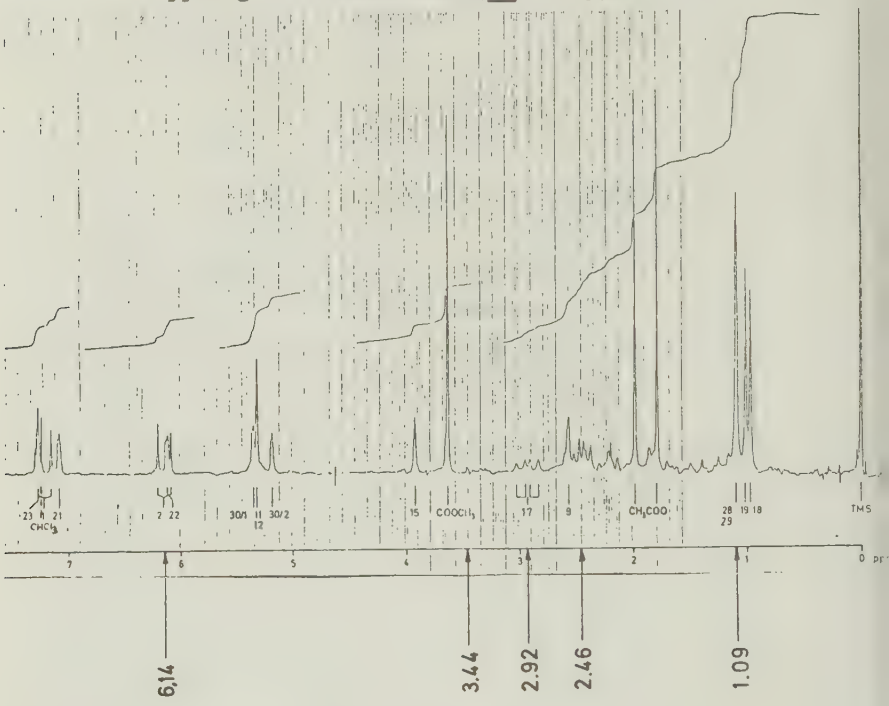
m) Die Zuordnung der ^{13}C-NMR-Daten

Eine grobe Interpretation der ^{13}C-NMR-Daten wurde bereits unter 3.d) beschrieben. Die exakte Zuordnung der einzelnen ^{13}C-NMR-Signale kann jetzt erst durch selektive ^{1}H-^{13}C-Entkopplung getroffen werden, nachdem das ^{1}H-NMR vollständig interpretiert ist. Dabei muß die Sendleistung so gewählt werden, daß die ^{13}C-Satelliten der ^{1}H-Signale erfaßt werden. Dadurch werden die meisten Protonen miterfaßt. So behalten die betreffenden C-Atome entsprechend ihrer Multiplizität eine Residualkopplung, die um so größer ist, je weiter das betreffende Proton vom Einstrahlpunkt entfernt ist. Durch Vergleich der Residualkopplungen eines C-Atoms bei Einstrahlung bei verschiedenen ^{1}H-Frequenzen kann dessen relativer Standort zu anderen C-Atomen festgestellt werden, die ihrerseits durch selektive Entkopplung eindeutig bestimmt werden konnten. So ist es also nicht nötig, alle Protonen selektiv zu entkoppeln. Im Prinzip ist auch eine graphische Auswertung der Residualkopplungen möglich[60]. Sie versagt aber genau dort, wo man sie am nötigsten brauchte, nämlich dort, wo die ^{13}C-Signale sehr eng beieinanderstehen und die mit ihnen koppelnden ^{1}H-Signale ihrerseits ebenfalls dicht beieinanderstehen. Dann wirken sich Schwankungen in der Entkopplungsleistung so stark aus, daß die Zuordnung unsicher wird. Außerdem sind Methylenprotonen in Naturstoffen selten magnetisch äquivalent, so daß die ^{13}C-Signale auf Grund komplexer Kopplungen zu schwer interpretierbaren Tripletts mit einer Feinstruktur aufspalten.

Beschreibung der einzelnen Entkopplungsexperimente:

Entkopplung: s = stark, m = mittel, w = schwach
Residualkopplung: d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett
Reihenfolge der beobachteten ^{13}C-Signale mit zunehmender Residualkopplung entsprechend der Entfernung der betreffenden ^{1}H-Signale vom Einstrahlpunkt. Die Lage der eingestrahlten ^{1}H-Frequenzen ist aus Abb. 11 ersichtlich.

Abb. 11: Einstrahlfrequenzen bei der selektiven ^{1}H-^{13}C-Entkopplung von Toonacilin (26) in ppm.



Eingestrahlte ^{1}H-Frequenz H^{28} + H^{29} (1.09 ppm):

Beobachtete ^{13}C-Signale:

C^{28} und C^{29} (s). Diese Signale können nicht voneinander unterschieden werden, da die zugehörigen Protonsignale zusammenfallen.

C^{19} (m)

C^{18} (s)

2 x $\underline{CH_3}$-COO (q)

C^{6} und C^{16} (t)

C^{5} und C^{9} (d)

C^{17} (d)

O-CH_3 (q)

C^{15} (d)

Die quartären C-Atome C^4 und C^{10} sind durch Longrange-Entkopplung intensiver geworden, während C^{13} noch eine feine Longrangekopplung zeigt und somit zugeordnet werden kann. Außerdem sind die beiden $CH_3\underline{C}OO$-Signale relativ zu C^7 durch ^1H-^{13}C-NOE[61] intensiver und damit unterscheidbar geworden.

Eingestr. ^1H-Frequenz: Zwischen $H^{16/2}$ und $H^{6/1u.2}$ (2.46 ppm)

Beobachtete ^{13}C-Signale:

C^6(s)u.C^{16}(m) Da die beiden Protonen der $CH_2{}^{16}$-Gruppe viel weiter auseinanderliegen, als die der $CH_2{}^6$ - Gruppe, in deren Mitte eingestrahlt wurde, kann dem intensiver entkoppelten Signal C^6 und dem weniger intensiv entkoppelten C^{16} zugeordnet werden.

C^9(s)u.C^5(s) Obwohl die Protonen dieser C-Atome dicht beisammenliegen, kann auf Grund des Intensitätsverhältnisses der resultierenden Singuletts entsprechend dem Abstand vom Einstrahlpunkt unterschieden werden.

C^{17}(m)
O-CH_3(q)
C^{15}(d, 18 Hz)

C^{11}(d, 26 Hz) Nach der Identifizierung von C^{11} und C^{12} kann
C^{12}(d, 28 Hz) das Singulett dazwischen auf Grund seiner cha-
C^{14}(s) rakteristischen chem. Verschiebung nur C^{14} zugeordnet werden. Das Singulett dieses quartären C-Atoms erfährt hier eine relativ große Intensivierung durch Longrange-Entkopplung von H^9.

C^8(s)
C^7(s) In etwas geringerem Maße wird C^7 durch Longrange-Entkopplung von H^6 intensiviert.

Eingestr. ^{1}H-Frequenz: H^{17} (2.92 ppm)
Beobachtete ^{13}C-Signale:

C^{17}(s)	Die oben bereits getroffene Zuordnung der C-Sig-
C^{5} (w)	nale wird hier bestätigt. Die Residualkopplungen
C^{9} (d, 5Hz)	sind hier größer, trotz größerer Nähe zum Ein-
C^{15}(d, 22Hz)	strahlpunkt, da die Sendeleistung geringer war.
C^{11}(d, 40Hz)	(Einstr. 2.46 ppm: 2.5 W; Einstr. 2.92 ppm: 1.2W
C^{12}(d, 43Hz)	

Eingestr. ^{1}H-Frequenz: OCH_3 (3.44 ppm)
Im ^{13}C-NMR-Spektrum wird das Quartett der Methylestergruppe selektiv entkoppelt, gleichzeitig erfährt das Singulett von C^{7} eine starke Erhöhung durch ^{1}H-^{13}C-NOE.

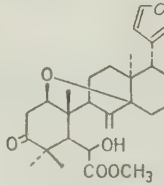
Eingestr. ^{1}H-Frequenz: H^{22} und H^{2} (6.14 ppm)
Beobachtete ^{13}C-Signale:

C^{22}(s)	Zur sicheren Zuordnung dieser Signale war ein
C^{2} (s)	Vergleich mit den δ-Werten von 6-Acetoxytoona-
C^{30}(t)	cilin nötig. Dort wurde die Unterscheidung zwi-
C^{21}(d, 17Hz)	schen Furan- und Olefin-C-Signalen aufgrund der
C^{23}(d, 19Hz)	Kopplungskonstanten im "Gated decoupled" ^{13}C-NMR
C^{1} (d, 10Hz)	getroffen.
C^{20}(s)	Dieses Singulett wird intensiver durch Long-
	range-Entkopplung von H^{22}.

Durch die beschriebenen Experimente sind alle ^{13}C-Signale bis auf die von C^{4} und C^{10} zugeordnet worden. Zur Unterscheidung dieser Signale wurde ein Vergleich mit 6-Acetoxytoonacilin (27) und 6-Hydroxymethylangolensat (31)[62] angestellt. (Tabelle 5)

Tabelle 5:
Vergleich der ^{13}C-chem. Verschiebung (δ, ppm, in $CDCl_3$) der quartären C-Atome:

	(26)	(27)	(31)
C^{4}	46.0	46.7	49.8
C^{10}	44.7	44.7	45.7
C^{13}	41.9	42.7	42.4



(31)

Die interpretierten ^{13}C-NMR-Daten von (26) und (27) sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Tabelle 6: ^{13}C-NMR-Daten von (26)u. (27) (δ-Werte in ppm bez. auf TMS = 0, Lsgm.: $CDCl_3$)

C-Atom	(26)	(27)
1	151.8 d	150.2 d
2	126.7 d	127.0 d
3	202.5 s	202.0 s
4	46.0 s[1)]	46.7 s[1)]
5	44.3 d	47.2 d
6	31.9 t	71.1 d
7	174.0 s	170.8 s
8	135.7 s	135.2 s
9	57.2 d	57.6 d
10	44.7 s[1)]	44.7 s[1)]
11	74.6 d	74.6 d
12	70.3 d	70.0 d
13	41.9 s	42.7 s
14	72.4 s	72.3 s
15	60.3 d	60.2 d
16	32.8 t	32.8 t
17	38.6 d	38.7 d
18	14.3 q	14.2 q
19	20.0 q	19.5 q
20	122.9 s	122.8 s
21	140.1 d	140.1 d
22	111.5 d	111.5 d
23	142.3 d	142.3 d
28	23.0 q[2)]	25.2 q
29	22.7 q[2)]	21.5 q
30	120.7 t	121.2 t
$-C(=O)-O-\underline{C}H_3$	51.9 q	52.5 q
$-O-\underline{C}(=O)-CH_3$	20.6 q	20.4 q
	20.8 q	20.7 q
	-	20.9 q
$-O-\underline{C}(=O)-CH_3$	168.9 s	168.6 s
	169.7 s	169.5 s
	-	170.0 s

1), 2) Die betreffenden Zuordnungen müssen evtl. vertauscht werden.

n) Interpretation des Infrarotspektrums (Abb. 4)[63-65] (KBr)

st = stark, m = mittel, s = schwach, ss = sehr schwach; ν = Streckschwingung, δ = Deformationsschwingung (oop = out of plane, s = symmetrisch, as = asymmetrisch), ω = Streckschwingung von Gerüstatomen.

Frequenz (cm^{-1})	Int.	Interpretation
3165	ss	ν_{CH}, Furan
3145	ss	- "-
3082	ss	ν_{CH}, $=CH_2$
3027	ss	ν_{CH},
3004	ss	ν_{CH},
2980	m	ν_s, C-H, CH_3-C(=O)-O-
2955	s	ν_s, C-H, CH_3-
2940	s	ν_{as}, C-H, $-CH_2-$
2882	ss	ν_{as}, C-H, CH_3-
1745	st	ν, C=O, Ester
1688	st	ν, C=O, Cyclohexenon
1504	s	ν, C-O-C, Furan
1462	m	δ_s, C-H, $-CH_2-$
1440	m	δ_{as}, C-H, CH_3-C(=O)-O u. -C(=O)-O-CH_3
1398	m	δ_s, C-H,
1387	m	
1372	st	δ_s, C-H, CH_3-C(=O)-O
1247	st	ν_{as}, C-C(=O)-C, Acetat ν_s, C-O-C, Epoxid
1150	m	ν_{as}, C-C(=O)-C, Methylester
1043	st	ω, Kohlenstoffgerüst
933	m	δ_{oop}, C-H, $=CH_2$
881	m	δ_{oop}, C-H, Furan
874	m	
839	m	ν_{as}, C-O-C, Epoxid

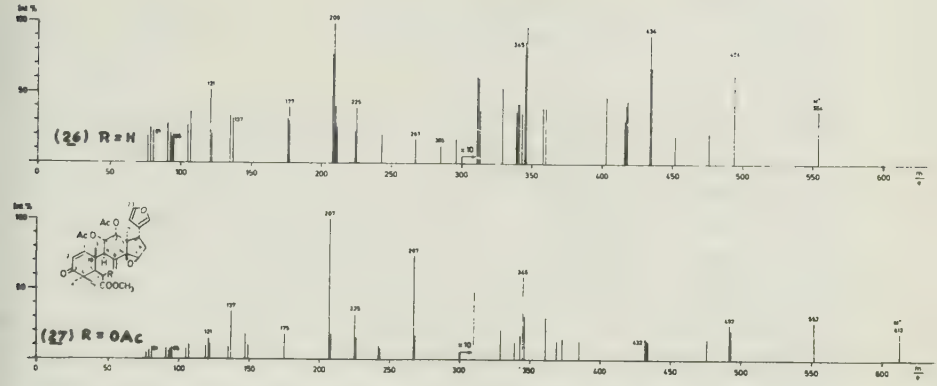
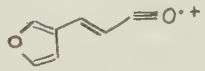
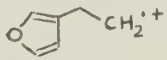
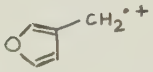


Abb. 12: Massenspektren von Toonacilin (26) und 6-Acetoxytoonacilin (27).

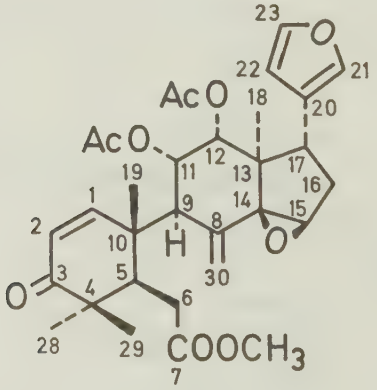
o) Interpretation des Massenspektrums (Abb. 12)[66]

m/e	Int.(%)	Interpretation
554	3.8	M^+
494	7.6	$M^+ - CH_3COOH$
476	2.2	$M^+ - CH_3COOH - H_2O$
434	9.2	$M^+ - 2x\ CH_3COOH$
416	3.1	$M^+ - 2x\ CH_3COOH - H_2O$
346	9.8	Ring C-D-Fragment
345	8.7	
285	12.5	- " - - CH_3COOH
267	17.3	- " - - $CH_3COOH - H_2O$
225	39.5	- " - - 2 x CH_3COOH
209	100	Ring A-Fragment
208	78	
177	40	- " - - CH_3OH
137	32	- " - -C^5-Seitenkette

m/e	Int.(%)	Interpretation
121	52	
95	20	
81	23	
43	112	$CH_3-C\equiv O^+$

p) Die Struktur von Toonacilin (26)

Unter Einbeziehung der bis hier beschriebenen Argumente ergibt sich für Toonacilin die folgende Struktur:



(26)

4.) Strukturaufklärung von 6-Acetoxytoonacilin (27)

$C_{33}H_{40}O_{11}$. Ber. C = 64.69 %, H = 6.57 %. Gef. C = 64.69 %, H = 6.58 %. Schmp. 215°C (aus Methanol), α_D^{20} = + 42.5° ($CHCl_3$, c = 1).

a) Identifizierung durch Spektrenvergleich mit Toonacilin

Die IR-Spektren (Abb. 4) der beiden Substanzen sind praktisch identisch.

Das Massenspektrum (Abb. 12) zeigt mit m/e = 612 einen um 58 Masseneinheiten höheren M^+-Peak, was auf eine zusätzliche Acetoxygruppe schließen läßt. Das Fragmentierungsmuster ist nach Abspaltung von Essigsäure dem von Toonacilin ähnlich. Die Sequenz m/e 612, 552, 492, 432 zeigt 3malige Essigsäureabspaltung. Die Fragmente m/e 345 und 225 weisen auf dieselbe Ring-CD-Struktur hin wie bei Toonacilin. Die Sequenz 267 (Ring A-Fragment), 207 (Basispeak), 175, 137 zeigt, daß die zusätzliche Acetoxygruppe nur in Position 6 stehen kann.

Im ^{1}H-NMR-Spektrum (δ, ppm, $CDCl_3$) (Abb. 2, Tabelle 4) erkennt man neben einer zusätzlichen Acetoxygruppe (2.21) eine starke Tieffeldverschiebung der 4α-CH_3-Protonen (1.39, $\Delta\delta$ = 0.3) und eine schwächere der 4ß-CH_3-Protonen (1.17, $\Delta\delta$ = 0.08), während die δ-Werte der 10ß-und 13α-CH_3Gruppen fast unverändert bleiben. Diese Tatsache wurde zur Zuordnung der Methylprotonen benutzt (vergl. 3.) k)). Während das AMX-System $CH_2{}^{16}/H^{17}$ unverändert erhalten geblieben ist, fehlt das ABX-System $CH_2{}^6/H^5$. H^6 taucht in der Gruppe der -CH-O-Signale bei 5.31 als breites Singulett auf. H^5 ist als breites Singulett (2.72) neben dem breiten Singulett von H^9 (2.69) zu finden. Bei schwacher Einstrahlung auf H^6 (H^{11}) (5.31) wird das Singulett bei 2.72 schärfer, bei schwacher Einstrahlung auf $H^{30/2}$ (5.58) wird das Singulett bei 2.69 schärfer. Da die darauf beruhende Zuordnung von H^5 und H^9 unsicher war, wurden die ^{13}C-Signale von C^5 und C^9 auf Grund ihrer ^{13}C-^{1}H-Kopplungskonstanten zugeordnet und die ^{1}H-chem. Verschiebung von H^5 und H^9 durch selektive ^{13}C-^{1}H-Entkopplung bestätigt (siehe dort). Die Unterscheidung der beiden Dubletts von H^{11} (5.33) und H^{12} (5.25) (J = 4.4 Hz) wurde dadurch getroffen, daß das Dublett bei 5.25 bei Einstrahlung auf die 13-CH_3-Gruppe schlanker wird.

Die Signale des ^{13}C-NMR-Spektrums (δ, ppm, $CDCl_3$) (Abb.13, Tab.6) wurden durch PND-, Off Resonance-, Gated Decoupling-

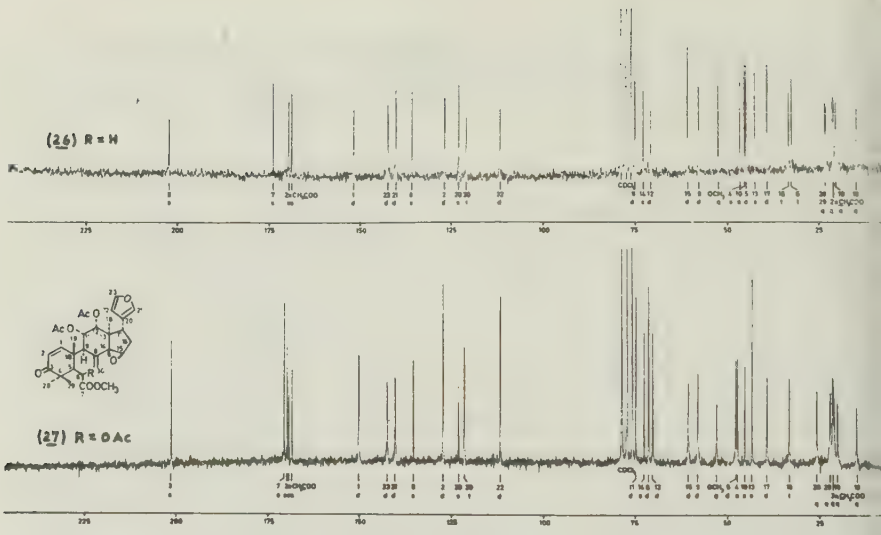


Abb. 13: Vergleich der ^{13}C-NMR-Spektren von Toonacilin (26) und 6-Acetoxytoonacilin (27).

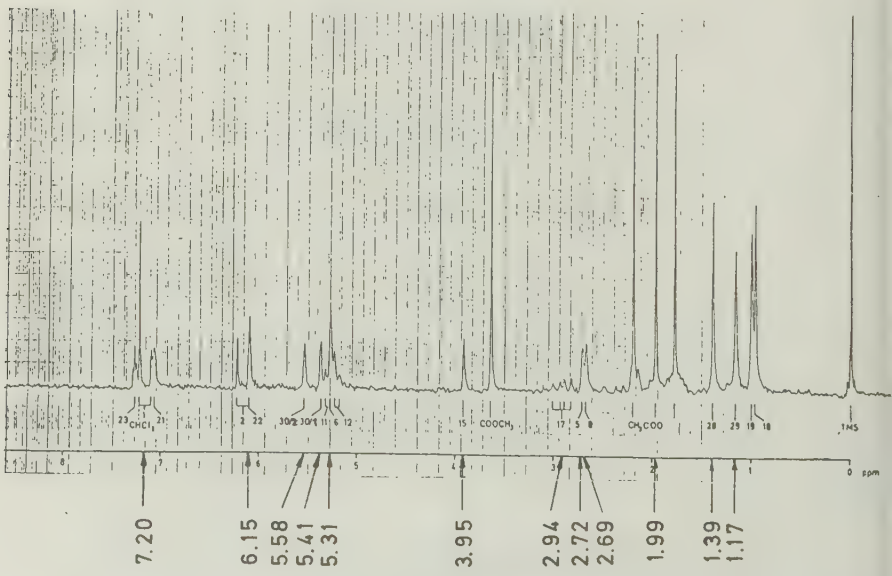


Abb. 14: Einstrahlfrequenzen bei der selektiven ^{1}H-^{13}C-Entkopplu von 6-Acetoxytoonacilin (27) in ppm.

und 12 CW-Decoupling-Experimente unabhängig von denen des Toonacilins zugeordnet. Wie Tab. 6 zeigt, stimmen die Werte sehr gut überein, außer bei den Positionen 5 - 7, 28 und 29, für die man eine Abweichung wegen der in Position 6 hinzugekommenen Acetoxygruppe erwartet. Zusätzliche Signale für die 6-Acetoxygruppe wurden bei 20.9 und 170.0 gefunden. C^6 erfährt eine Tieffeldshift nach 71.1. Im folgenden werden nur die Experimente beschrieben, die sich von den bei Toonacilin durchgeführten grundsätzlich unterscheiden. Die Lage der eingestrahlten ^{1}H-Frequenzen bei der selektiven ^{1}H-^{13}C-Entkopplung ist aus Abb. 14 ersichtlich.

1.) Die Zuordnung der Methylsignale und der zugehörigen quartären C-Atome:

Bei selektiver Einstrahlung der ^{1}H-Frequenz von 4α- und der von 4ß-CH_3 wurden die ^{13}C-Signale von C^{28} und C^{29} entkoppelt und konnten so sicher zugeordnet werden. Theoretisch hätte hier eine Unterscheidung von C^4 und C^{10} auf Grund unterschiedlicher Longrange-Entkopplung möglich sein sollen. Dies gelang nicht, da ein Ast des Residual-Dubletts von C^5 mit dem Singulett von C^4 oder C^{10} zusammenfiel.

Die Unterscheidung der drei Methylsignale der Acetoxygruppen von den restlichen beiden angulären Methylgruppen 18 und 19 wurde durch Einstrahlung der ^{1}H-Frequenz der mittleren Acetoxygruppe und Messung der Residualkopplung getroffen. Dabei konnten auch im Carbonylbereich die drei Acetoxycarbonyle von C^7 unterschieden werden, da alle drei durch Longrange-Entkopplung wesentlich schärfer wurden.

2.) Die Unterscheidung der olefinischen von den Furan-Signalen und die Zuordnung von C^5 und C^9:

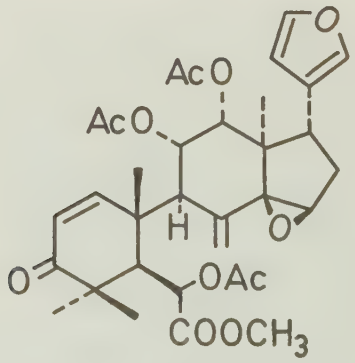
Diese Unterscheidung wurde anhand der ^{13}C-^{1}H-Kopplungskonstanten im "Gated decoupled"-^{13}C-NMR getroffen. Mit der "Gated Decoupling"-Technik[67] erhält man ^{13}C-^{1}H-gekoppelte Spektren bei verbessertem Signal/Rausch-Verhältnis unter Ausnutzung des NOE.

Folgende Kopplungskonstanten in Hz wurden ermittelt (Erwartungswerte nach[68] in Klammern):

C^1	160	(156)
C^2	160	(156)
C^6	120	(120)
C^9	128	(124)
C^{21}	198	(198)
C^{22}	175	(167)
C^{23}	198	(198)

Zwischen C^1 und C^2 wurde durch Einstrahlung der H^1-Frequenz, zwischen C^{21} und C^{23} durch Einstrahlung der H^{22}-Frequenz und Beobachtung der Residualkopplungen unterschieden. Die Residualkopplungen für C^5 von 48 Hz und C^9 von 53 Hz bei Einstrahlung der H^1-Frequenz zeigen, daß H^5 im ^{1}H-NMR relativ z. H^9 bei tieferem Feld liegen muß, d.h. die oben gemachte Zuordnung der ^{1}H-Signale von H^5 und H^9 wird bestätigt.

b) Die Struktur von 6-Acetoxytoonacilin (27)



(27)

Die aus den Spektren weitgehend abgeleitete Struktur und Stereochemie von (27) wurden durch eine Röntgenstrukturanalyse bewiesen[69]. Die Substanz kristallisiert orthorombisch in der Raumgruppe $P2_12_12_1$-D_2^4 mit a = 1327.5 (6), b = 989.1 (
c = 2478.2 (10), pm und Z = 4 Molekeln in der Elementarzelle

Die Messung der Intensitäten erfolgte auf einem SYNTAX-$P2_1$-Vierkreisdiffraktometer ($MoK\alpha,\omega$-scan, T ≈ 130° K). Am Ende der Verfeinerung (alle H-Atome einbezogen) betrug der konventionelle R-Wert R = 0.050 für 2976 Reflexe mit $I > 2\sigma(I)$. Das Ergebnis ist in der Abb. 15 (ORTEP)[70] dargestellt.

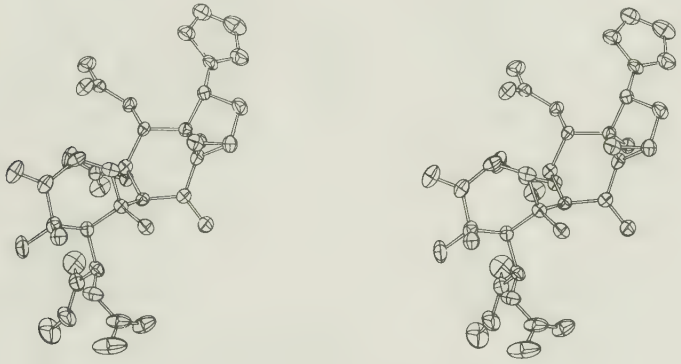
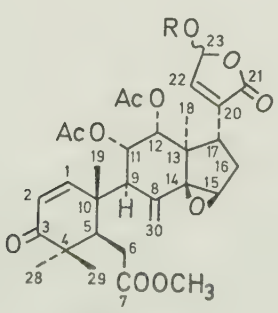


Abb. 15: Kristallstruktur von 6-Acetoxytoonacilin (27) (ORTEP-Darstellung).

6.) Die Strukturaufklärung der Hydroxytoonacilide

a) 23-Hydroxytoonacilid (28): $C_{31}H_{38}O_{11}$; hochaufgelöstes MS: m/e 586.24078 (M^+, ber. 586.24141) Schmp: 154-155°C (aus CH_3OH).



(28): R=H

(30): R=Ac

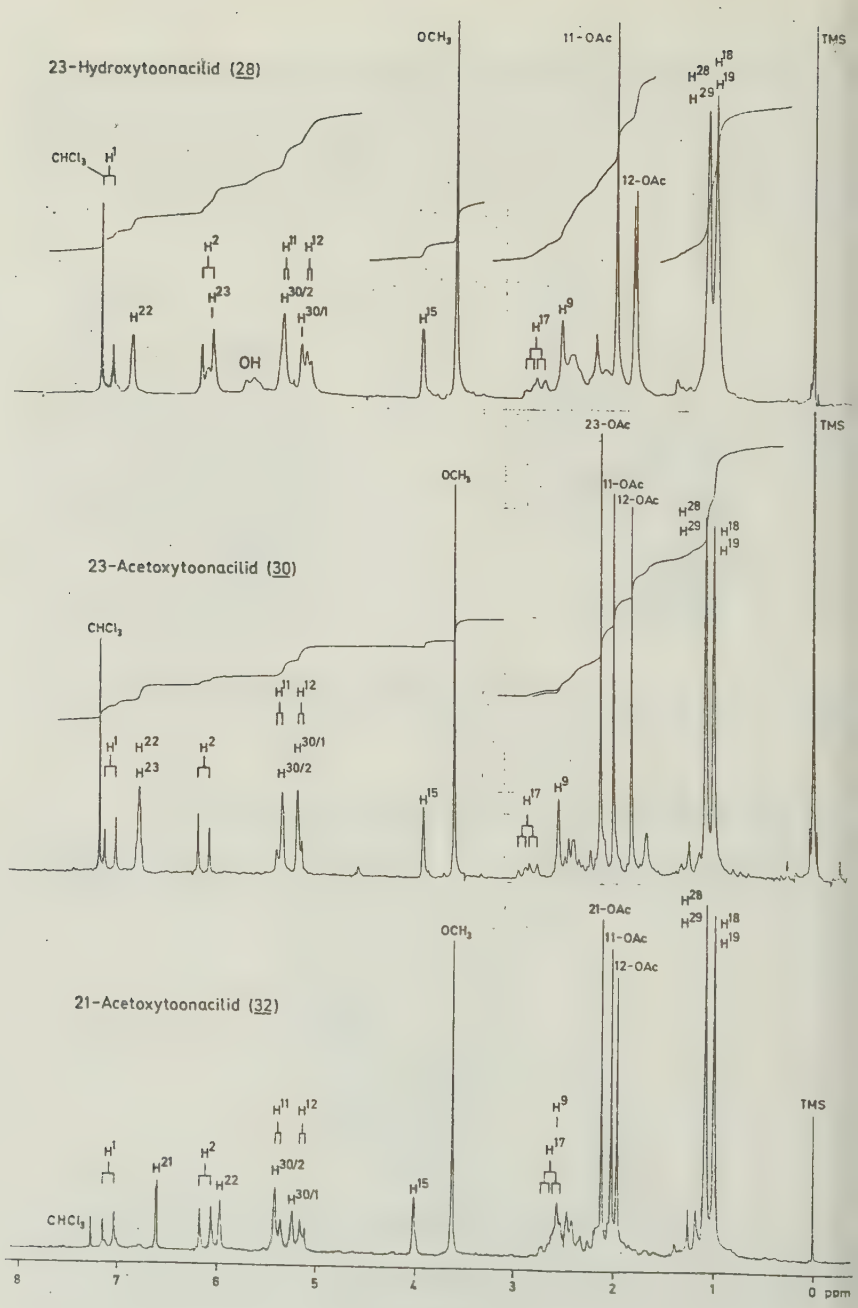


Abb.16: ^{1}H-NMR-Spektren von (28), (30) und (32). 90 MHz-Aufnahmen in $CDCl_3$.

Tabelle 7: ^{1}H-NMR-Daten von (28) und (29) (δ-Werte in ppm bez. auf TMS = 0, Kopplungskonstanten in Hz, Lsgm.: $CDCl_3$)

H-Atom	(28)	(29)
1	7.22 d, J = 10.6	7.19 d, J = 10.6
2	6.19 d, J = 10.6	6.16 d, J = 10.6
9	2.55 br. s	2.57 br. s
1	5.42 d, J = 4.1	5.43 d, J = 4.1
2	5.15 d, J = 4.1	5.21 d, J = 4.1
5	3.98 br. s	4.00 br. s
7	2.84 q, ABX J_{AX+BX} = 17.7	2.81 q, ABX J_{AX+BX} = 17.3
8	0.97 s	0.98 s
9	0.99 s	0.99 s
1	-	5.87 br. s
2	6.96 br. s	5.95 br. s
3	6.16 br. s	-
0/1	5.22 br. s	5.24 br. s
0/2	5.41 br. s	5.42 br. s
8	1.07 s	1.08 s
9	1.07 s	1.08 s
-CH_3	3.64 s	3.65 s
1-OAc	2.01 s	2.04 s
2-OAc	1.80 u. 1.83 s	1.99 s
4-OAc	-	-
3-OAc	-	-

Tabelle 8: ^{1}H-NMR-Daten von (30) und (32) (δ-Werte in ppm bez. auf TMS = 0, Kopplungskonstanten in Hz, Lsgm.: $CDCl_3$)

H-Atom	(30)	(32)
1	7.15 d, J = 10.6	7.13 d, J = 10.6
2	6.21 d, J = 10.6	6.11 d, J = 10.6
9	2.58 br. s	2.58 br. s
11	5.43 d, J = 4.0	5.41 d, J = 4.1
12	5.22 d, J = 4.0	5.17 d, J = 4.1
15	3.96 br. s	4.04 br. s
17	2.90 q, ABX J_{AX+BX} = 17.9	2.66 q, ABX J_{AX+BX} = 17.7
18	1.00 s	1.00 s
19	1.00 s	1.00 s
21	-	6.64 d, $^4J_{H22/H21}$ 0.9
22	6.85 br. s	6.01 d, d, $^4J_{H22/H21}$ 0.9
23	6.85 br. s	- $^4J_{H22/H17}$ 1.0
30/1	5.24 br. s	5.27 br. s
30/2	5.40 br. s	5.44 br. s
28	1.08 s	1.08 s
29	1.08 s	1.08 s
O-CH_3	3.65 s	3.65 s
11-OAc	2.03 s	2.04 s
12-OAc	1.84 s	1.98 s
21-OAc	-	2.14 s
23-OAc	2.16 s	-

Tabelle 9: ^{13}C-NMR-Daten von (28), (30) und (32) (δ-Werte in ppm bez. auf TMS = 0, Lösungsmittel: $CDCl_3$.

C-Atom	(28)	(30)[a]	(32)[a]
1	152.1 d	151.3 d	150.8 d
2	126.6 d	127.0 d	126.7 d
3	203.2 s	202.3 s	202.1 s
4	45.9 s	45.9 s	45.7 s
5	44.1 d	44.3 d	44.0 d
6	31.8 t	31.9 t	31.6 t
7	174.0 s	174.0 s	173.7 s
8	135.2 s	135.2 s	134.3 s
9	57.3 d	57.4 d	56.7 d
10	45.0 s	45.3 s	45.7 s
11	69.8 d	69.8 d	69.4 d
12	74.7 d	74.4 d	74.8 d
13	41.9 s	41.9 s	41.7 s
14	71.9 s	71.9 s	72.4 s
15	60.1 s 60.2 s	59.9 d	59.9 d
16	31.0 t 31.4 t	31.0 t	31.6 t
17	37.7 d 37.8 d	38.5 d	40.3 d
18	14.0 q	14.0 q	14.4 q
19	19.9 q	20.0 q	19.8 q
20	135.2 s	136.9 s	165.3 s
21	171.7 s	169.7 s	93.9 d
22	147.2 d 147.5 d	144.0 d	121.5 d
23	96.6 d 96.8 d	92.1 d	169.0 s
28	22.6 q[+)]	23.0 q[+)]	22.7 q[+)]
29	22.8 q[+)]	22.7 q[+)]	22.4 q[+)]
30	121.3 t	121.4 t	121.9 t
$-C(=O)-O-\underline{C}H_3$	51.9 q	51.9 q	51.7 q
$-O-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-\underline{C}H_3$	20.5 q	20.4 q	20.4 q
	20.8 q	20.7 q	20.5 q
	-	20.8 q	20.7 q
$-O-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_3$	169.4 s	168.8 s	168.8 s
	170.2 s	169.0 s	168.8 s
	-	169.2 s	169.3 s

[+)] Zuordnung unsicher

a) Die Daten gehören jeweils zu dem im Epimerengemisch überwiegenden γ-Acetoxybutenolid.

Die ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Daten von (28) sind denen des Toonacilins (26) sehr ähnlich (Tab. 7 und 9). Abweichungen treten vor allem im Bereich des Substituenten an C^{17} auf: An Stelle der Furanprotonen findet man im ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb. 16) zwei Signale bei 6.16 und 6.96 ppm, sowie ein OH-Proton, das durch D_2O-Austausch nachgewiesen werden kann. Diese Daten wiesen auf das Vorliegen einer δ-Hydroxybutenolidstruktur hin, die auch durch Synthese aus (26) bewiesen wurde (s.u.). Die Unterscheidung zwischen den Strukturen (28) und (29) erfolgte auf Grund der stark unterschiedlichen chemischen Verschiebung von H^{22}. Aus der Aufspaltung der Signale der Acetoxygruppe an C^{12} im ^{1}H-NMR, sowie der ^{13}C-NMR-Signale der C-Atome 15-17, 22 und 23 geht hervor, daß (28) als C^{23}-Epimerengemisch im Verhältnis 1:1 vorliegt.

Im ^{13}C-NMR konnten die Signale unter 75 ppm durch Vergleich mit Toonacilin (26) zugeordnet werden. Die übrigen Signale wurden mittels selektiver Entkopplung durch Einstrahlung der H^{22}, H^{23} und $H^{30/2}$-Frequenz identifiziert. Das Singulett bei 171.7 ppm wurde durch Longrange-Entkopplung von H^{22}-C^{21} zugeordnet und so von C^{7} und den Acetoxycarbonylen unterschieden. Unter dem Singulett bei 135.2 ppm verbergen sich die Signale von C^{8} und C^{20}. Das wurde durch Integration in einem breitbandentkoppelten Spektrum nachgewiesen, das nach der "Invers Gated Decoupling"-Technik[67], also ohne NOE, aufgenommen worden war.

Im IR-Spektrum (KBr) unterschied sich 23-Hydroxytoonacilid (28) von Toonacilin (26) durch die OH-Bande bei 3430 cm^{-1}, sowie durch unterschiedliche Gerüstschwingungen im Fingerprint-Bereich. Die für Furan charakteristischen Banden fehlen.

Im Massenspektrum zeigten sich Unterschiede zu Toonacilin erwartungsgemäß bei Fragmenten aus dem Bereich der Ringe C und D, während die Sequenz m/e = 209, 177, 137 aus dem Ring A erhalten geblieben ist. (Vergl. Abb. 17).

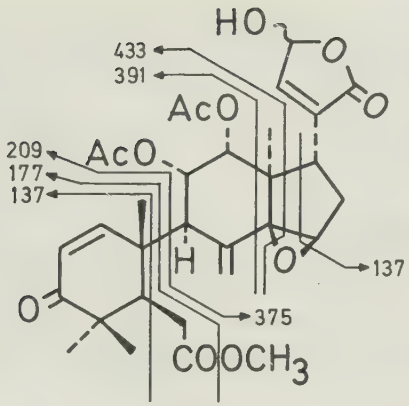
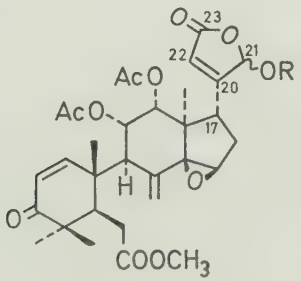


Abb. 17: Interpretation wichtiger Gerüstfragmente im Massenspektrum von 23-Hydroxytoonacilin.

Bei der Acetylierung der OH-Gruppe mit Acetanhydrid in Pyridin wurde 23-Acetoxytoonacilid (30) erhalten. Dabei entstand überwiegend eines der beiden Epimeren, das aus Methanol kristallisierte: Schmp. 188-189°C, $\alpha_D^{20} = +47^\circ$ (C = 1, $CHCl_3$). Die Konfiguration an C^{23} konnte vorerst nicht einwandfrei bestimmt werden. Die obenerwähnte Aufspaltung der NMR-Signale (Abb. 16, Tab. 8) wurde nicht mehr beobachtet, was insbesondere die Zuordnung im ^{13}C-NMR-Spektrum (Tab.9) erleichterte.

b) 21-Hydroxytoonacilid (29): $C_{31}H_{38}O_{11}$, hochaufgelöstes MS: m/e 586.23264 (M^+, ber. 586.24141). (29) konnte nicht kristallin, sondern nur als harter Schaum erhalten werden.



(29): R=H

(32): R=Ac

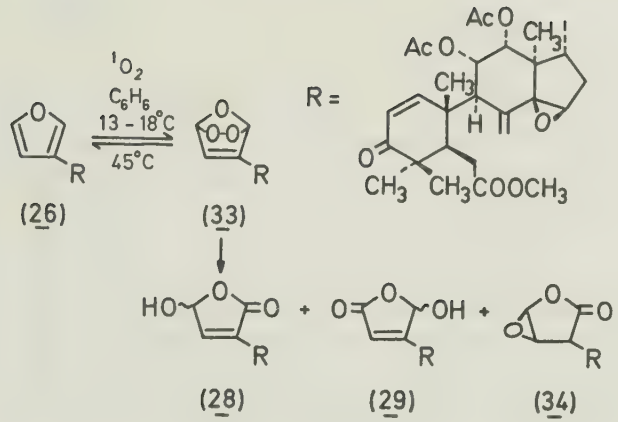
Das IR- und das Massenspektrum von (29) sind mit den Spektren von (28) fast identisch. Das ^{1}H-NMR wird in Tabelle 7 mit dem von (28) verglichen. (29) liegt ebenfalls als Epimerengemisch vor, und zwar im NMR-spektroskopisch bestimmten Verhältnis 3:1.

Durch Acetylierung zu 21-Acetoxytoonacilid (32) konnte ebenfalls eine Anreicherung eines der beiden Epimeren beobachtet werden. (^{1}H-NMR-Spektrum siehe Abb. 16, Daten Tab. 8) Dieses konnte aber nicht abgetrennt werden. Trotzdem wurde auch hier durch die Acetylierung die Zuordnung der ^{13}C-NMR-Signale (Tab. 9) erleichtert.

c) Darstellung der Hydroxytoonacilide durch Photooxidation von Toonacilin (26)

Zum Nachweis dafür, daß bei den Hydroxytoonaciliden lediglich der Furanring von (26) zu den isomeren γ-Hydroxybutenoliden oxidiert, der Stammkörper aber unverändert geblieben ist, wurden die Hydroxytoonacilide aus Toonacilin wie folgt dargestellt:

Eine benzolische Lösung von (26) wurde mit einer Quecksilber-Hochdruck-UV-Lampe bei 13-18°C unter Sauerstoffbegasung nach der Methode von Lavie[71] belichtet. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt. Nach 4.5 Std. war das Ausgangsprodukt (26) vollständig umgesetzt. Die säulenchromatographische Trennung der Reaktionsprodukte lieferte (28) als Hauptprodukt neben (34) und Spuren von (29). Zusätzlich isolierte ich beträchtliche Mengen (ca. 50 % des Ausgangsprodukts) (26), welches offenbar bei der Aufarbeitung in einer Retro-Diels-Alder-Reaktion aus dem endo-Peroxid (33) entstanden war. (28) und (29) waren mit den aus Toona ciliata isolierten Naturstoffen identisch (Abb.16u.18)Das Ausbeute-Verhältnis von (28) und (29) (100:1) weicht stark von dem im Rindenextrakt gefundenen Verhältnis (2:1) ab. Hieraus läßt sich schließen, daß es sich bei den aus Meliaceen isolierten γ-Hydroxybutenoliden nicht um Artefacte handelt[71].



(26) (33) (28) (29) (34)

Der Verlauf der Photooxidation über (33) scheint durch viele analoge Beispiele gesichert[72], ebenso die Umlagerung nach (28) und (29) im Sinne einer Kornblum-De La Mare-Reaktion[73]. Dagegen ist die Bildung eines ß,ɣ-Epoxybutanolids wie (34) meines Wissens noch nicht beschrieben worden.

Die Struktur von (34) folgt aus den MS-, IR- und NMR-Spektren im Vergleich mit (28): Das MS zeigt bei gleichem M^+-Peak ein sehr ähnliches Fragmentierungsmuster mit einem wesentlich stärkeren M^+-CO_2-Fragment. Im IR-Spektrum fehlt die OH-Bande, dafür erscheint eine zusätzliche Bande bei 1798 cm^{-1} die dem Lactoncarbonyl des ß,ɣ-Epoxybutanolids zugeordnet wurde. Im ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb. 18) war eine wesentliche Änderung der Protonensignale des C^{17}-Substituenten zu beobachten. An Stelle des OH-Protons und der Signale bei 6.16 ppm (H^{23}) und 6.96 ppm (H^{22}) fand ich nun ein breites Triplett bei 3.03 ppm (H^{20}), ein scharfes Triplett bei 3.78 ppm (H^{22}) und ein scharfes Dublett bei 5.55 ppm (H^{23}). Die Zuordnung erfolgte auf Grund der chemischen Verschiebung sowie durch Entkopplungsexperimente.

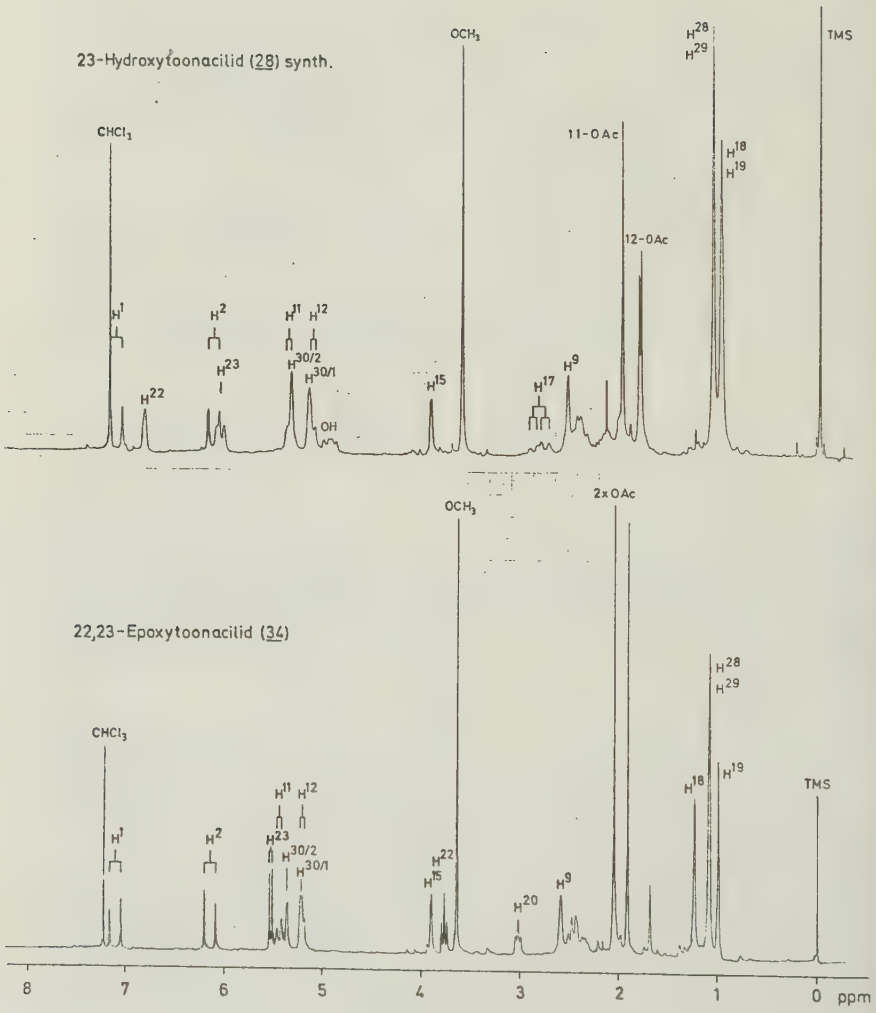
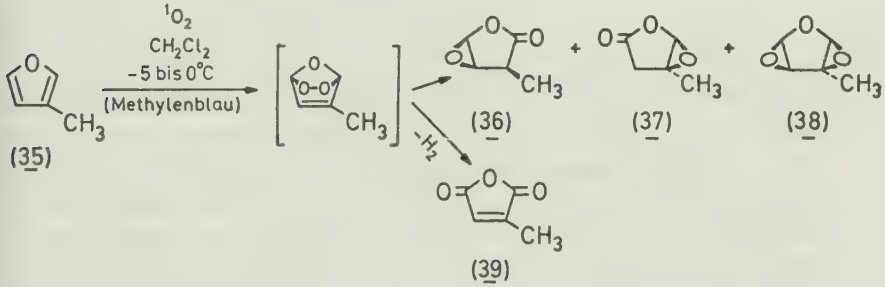


Abb. 18: ^{1}H-NMR-Spektren von 23-Hydroxytoonacilid (28) und 22,23-Epoxytoonacilid (34), die durch Photooxidation von Toonacilin (26) als Hauptprodukte gewonnen wurden. 90 MHz-Aufnahmen in $CDCl_3$.

6.) Die Photooxidation von 3-Methylfuran in aprotischen Lösungsmitteln

Zur weiteren Absicherung der Struktur (34) untersuchte ich die Photooxidation von 3-Methylfuran (35) in Benzol und Methylenchlorid[74]. Unter den Bedingungen der Photooxidation von (26) entstanden aus (35) nur Polymere, ebenso bei der Reaktion in Methylenchlorid mit Methylenblau als Sensibilisator. Dagegen erhielt ich bei 0° bis -5°C in Methylenchlorid in Gegenwart von Methylenblau neben polymerem Material ein Gemisch von 3-Methyl-4,5-epoxy-dihydro-2-(3H)-furanon (36), 4-Methyl-4,5-epoxy-dihydro-2-(3H)-furanon (37), 3-Methyl-2,3,4,5-diepoxytetrahydrofuran (38) und Citraconsäureanhydrid (39), in welchem (36) den Hauptanteil stellte. γ-Hydroxybutenolide wurden nicht gefunden.



Das Gemisch ließ sich im Kugelrohr destillieren, aber nicht im praeparativen Maßstab trennen. Die Strukturen (36) bis (39) ließen sich jedoch auf Grund der charakteristischen ^{1}H-NMR-Signale im Gemisch (Tab. 10, Abb. 19) bestimmen.

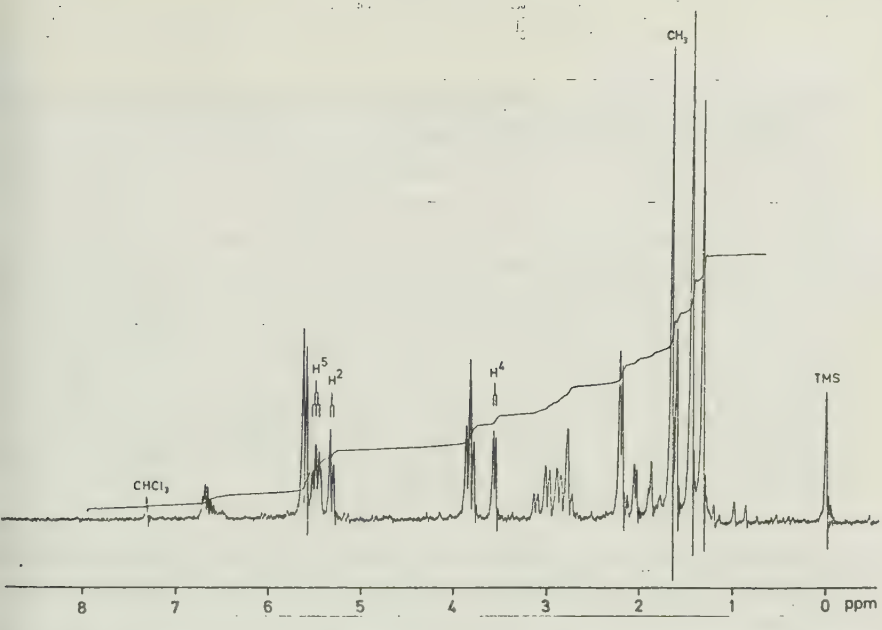
Auf Grund des unterschiedlichen Anteils der vier Komponenten am Gemisch konnten die zusammengehörenden Signalgruppen durch Integration eindeutig den einzelnen Komponenten zugeordnet werden. Die weitere Zuordnung erfolgte durch Entkopplungsexperimente. Die ß,γ-Epoxybutanolidstruktur des C^{17}-Substituenten von (34) wurde durch den Vergleich des NMR-Spektrums mit

dem von (36) bestätigt. Die chemische Verschiebung und die Kopplungskonstanten sind in beiden Verbindungen sehr ähnlich. Das α-Proton von (36) ist erwartungsgemäß auf Grund der Nachbarschaft zur Methylgruppe zu einem Oktett aufgespalten.

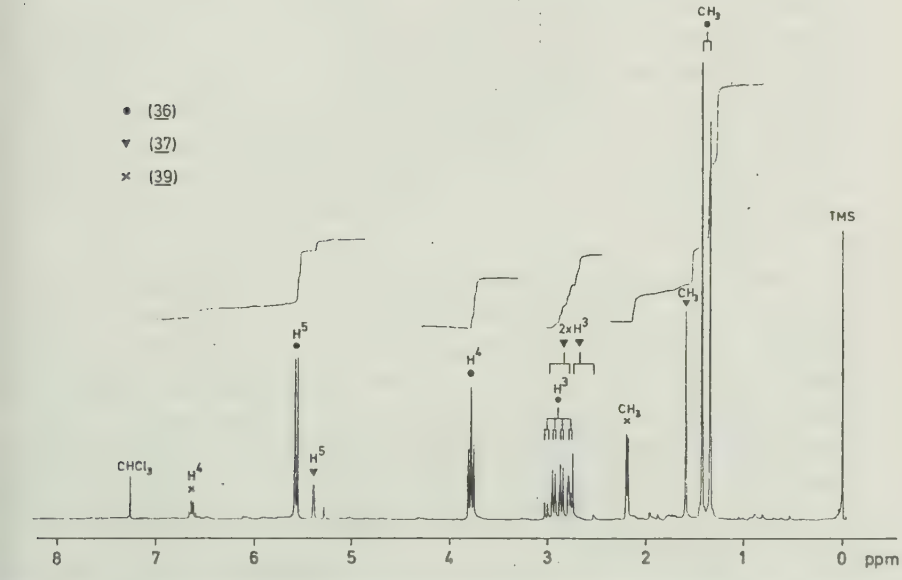
Tabelle 10: ^{1}H-NMR-Daten der Verbindungen (36) bis (39): δ-Werte bezogen auf TMS = 0; J in Hz, Lsgm. $CDCl_3$

Pos.	Verb. (36)	(37)	(38)	(39)
2	-	-	5.30 d (J=2.3)	-
3	2.91q.d(J=7.3,2.6)	2.85d,d(J=18.9,0.7) 2.71 d (J=18.9)		-
4	3.80d,d(J=2.4,2.6)	-	3.54 d (J=1.7)	6.66q(J=1.5
5	5.60 d (J=2.4)	5.43 d (J=0.7)	5.47d,d(J=1.7,2.3)	-
CH_3	1.40 d (J=7.3)	1.60 s	1.64 s	2.21d(J=1.5

Die Photooxidation von (35) in aprotischen Lösungsmitteln verläuft stereoselektiv. Sie folgt im wesentlichen den Reaktionswegen, die von Takeshita, Kanamori und Hatsui[76] bei der sensibilisierten Photooxydation von Spiro- 2,4 -hepta-4,6-dien gefunden worden sind. Eine analoge nachträgliche Umwandlung von (36) und (37) zu den entsprechenden γ-Hydroxybutenoliden auf der Kieselgelsäule wurde von mir nicht beobachtet. Die Verfolgung der Reaktion im NMR-Rohr (CD_2Cl_2 als Lösungsmittel) unter sonst gleichen Bedingungen zeigte, daß (36), (37), (38) und (39) während der Reaktion in konstanten Verhältnissen in offenbar unabhängigen, konzertierten Umlagerungen entstehen, und da insbesondere (36) und (37) nicht über (38) als Zwischenstufe entstehen. (38) ist die weitaus instabilste Komponente des Produktgemisches. Bei 7-tägiger Lagerung des destillierten Gemisches im Kühlschrank bei ca. 5°C wandelte es sich quantitativ in Polymere um. Dasselbe Ergebnis erhielt ich, wenn ich das Gemisch 10 Minuten mit Kieselgel behandelte. (36), (37) und (39) waren unter diesen Bedingungen stabil. Sie ließen sich sogar gaschromatographisch analysieren, wobei (36) und (37) allerdings nicht getrennt werden konnten.



bb. 19a: ^{1}H-NMR-Spektren der Photooxidationsprodukte von 3-Methylfuran nach der Destillation. Nur die Signale von (38) sind gekennzeichnet. 60 MHz-Aufnahme in $CDCl_3$.



bb. 19b: ^{1}H-NMR-Spektren der Photooxidationsprodukte von 3-Methylfuran nach Destillation und Behandlung mit Kieselgel. 90 MHz-Aufnahme in $CDCl_3$.

VI. Toonafolin, ein Tetranortriterpenoid aus den Blättern von Toona ciliata var. australis

1.) Isolierung

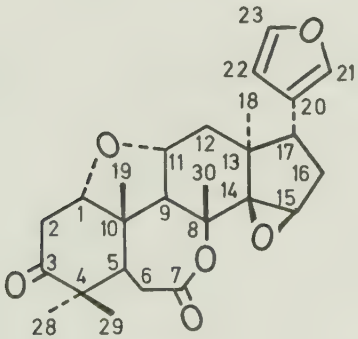
In einem Vorversuch, bei dem getrocknete Blätter nacheinander mit Petrolaether 30-50°C, Aether, Chloroform, Aceton und Methanol extrahiert worden waren, wurde festgestellt, daß sich die größte Antifeeding-Aktivität auf E. varivestis in dem Aetherextrakt befand, Daher wurde das Blattmaterial nur mit Aether extrahiert, wodurch auf die Abtrennung von Zuckern und Glycosiden verzichtet werden konnte.

20 kg getrocknete und gemahlene Blätter wurden in 2kg-Portionen je 60 Std. nach dem Soxhlet-Verfahren mit Aether extrahiert. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels verblieben 1117g Extrakt.

Zur Vorfraktionierung wurde der Extrakt in 3 Teile geteilt und jeder über 2.3 kg Kieselgel mit Methylenchlorid/Aceton (9:1) filtriert. Dabei wurden stark polare und polymere Stoffe zurückgehalten. Die eluierten Fraktionen wurden nach DC zu einer unpolaren Fraktion I (insgesamt 292 g) und einer polaren Fraktion II (insgesamt 613 g) vereinigt. Fraktion II enthielt nach DC kaum noch fette Öle, dafür den Hauptanteil an höheren Terpenoiden. Sie war von Chlorophyllen schwarzgrün gefärbt. Zur quantitativen Entfernung der Chlorophylle wurde die Fraktion II in Methylenchlorid/Aceton (9:1) gelöst, mit 735 g Aktivkohle aufgekocht und über Nacht stehen gelassen. Nach Filtration und Abziehen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer verblieb ein von Chlorophyllen befreiter brauner Extrakt (536 g). Dieser wurde nun über 4 kg Kieselgel chromatographiert und zwar mit Petrolaether 30-50°/Essigester 7:3 (Frakt. 1-5) 6:4 (Frakt. 6-7), 1:1 (Frakt. 8-9), und reinem Essigester (Frakt. 10-13). Frakt. 8 zeigte bei einem orientierenden Fraßtest bei 0.5proz. Lösung volle Fraßhemmung auf Epilachna varivestis.

Frakt. 8+9 (43.7 g) wurden weiter aufgetrennt auf 2 kg Kieselgel mit Methylenchlorid/Essigester (87.5 : 12.5). Aus den Fraktionen 2 u. 3 dieser Trennung (6.72 g) wurde durch Lösen in Essigester nach Zugabe von Aether eine kristalline, farblose Substanz gewonnen, die aus Essigester/Aether umkristallisiert und mit Aether gewaschen wurde. Insgesamt wurden 455 mg dieser Substanz rein isoliert. Schmp. 271°C (Zers.), α_D^{20}: + 73.8° ($CHCl_3$, C = 1).

Im Verlauf der weiteren Untersuchungen stellte sich heraus, daß die neue Verbindung, ein Tetranortriterpenoid, sich nicht auf eine bereits bestehende Struktur zurückführen läßt. Daher schlage ich für sie den Namen Toonafolin vor. Toonafolin kommt die Struktur (40) zu, deren Aufklärung mit chemischen und spektroskopischen Methoden im Folgenden beschrieben wird.



(40)

2.) Strukturaufklärung:

a) Die Hochauflösung des M^+-Peaks im Massenspektrum ergab die Masse 440.21941. Daraus folgten die Summenformel $C_{26}H_{32}O_6$ (berechnete Masse 440.21990) und ein R-Wert 11.

b) Die Elementaranalyse ergab 70.43 % C (ber. 70.89%) u. 7.31% H (ber. 7.32%) womit die Reinheit der Substanz bewiesen war.

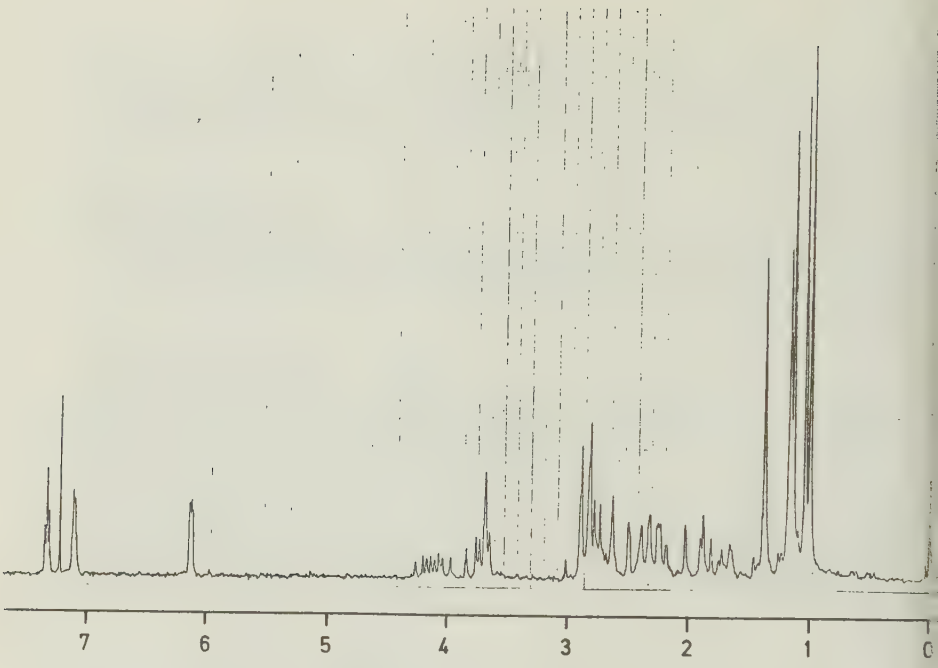


Abb. 20: ^{1}H-NMR-Spektrum von Toonafolin. 90 MHz-Aufnahme in $CDCl_3$

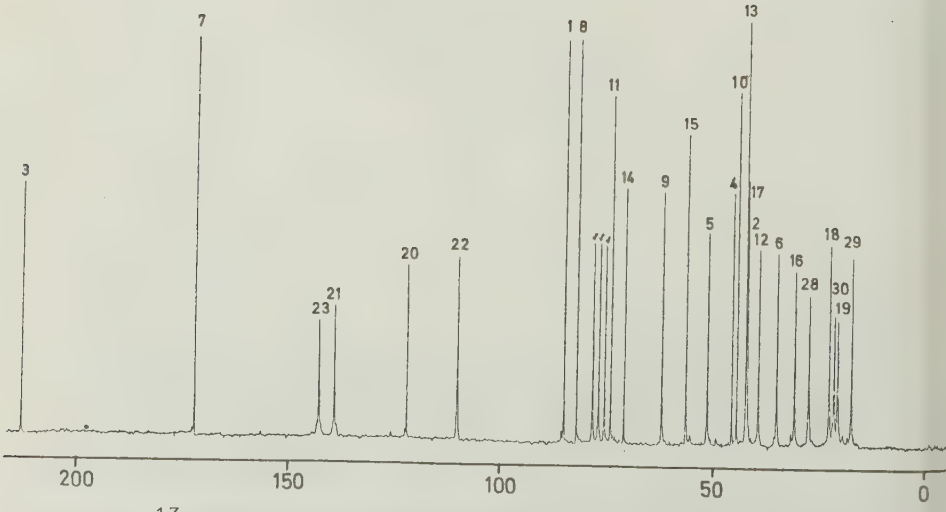


Abb. 21: ^{13}C-NMR-Spektrum von Toonafolin. 23 MHz-Aufnahme in $CDCl_3$
δ-Werte bezogen auf TMS = 0.

c) Das 90 MHz - ^{1}H - NMR (Abb. 20, δ, ppm, in $CDCl_3$) zeigte 11 Protonen im Methylenbereich (1.6-2.9), 15 Protonen entspr. 5 angulären Methylgruppen (1.00, 1.04, 1.14, 1.17 und 1.38), 3 -CH-O-Funktionen (3.70 (br.s.), 3.77 (dd), 4.14 (ddd), sowie 3 Signale bei 6.17, 7.15 und 7.38 ppm, die auf Grund ihrer chemischen Verschiebung und ihrer typischen Aufspaltung sofort als die Protonen eines 3-substituierten Furans identifiziert werden konnten. Olefinische Protonen waren nicht vorhanden, ebensowenig OH-Protonen, wie durch D_2O-Austausch bewiesen werden konnte. Diese Daten deuteten auf das Vorliegen eines unsubstituierten Tetranortriterpenoids hin.

d) Das PND-^{13}C-NMR (Abb. 21, δ, ppm, in $CDCl_3$) zeigte aufgelöst alle 26 C-Atome. Da nach dem Massenspektrum andere Heteroatome als Sauerstoff ausgeschlossen werden konnten und disubstituierte Dreifachbindungen in natürlich vorkommenden Triterpenoiden unwahrscheinlich sind, konnten die Signale bei 71.0, 74.2, 82.2 und 85.2 C-Atomen zugeordnet werden, die durch eine Einfachbindung mit Sauerstoff verbunden sind. Die Signale bei 110.5, 122.4, 139.4 und 143.1 wurden durch Vergleich mit Toonacilin dem Furanrest zugeordnet. Die chemische Verschiebung von 172.3 ist typisch für ein Estercarbonyl, die von 213.2 für ein Ketocarbonyl. Aldehydfunktionen konnten auf Grund des ^{1}H-NMR-Spektrums ausgeschlossen werden, auch sind dort keine Esterprotonen erkennbar. Daher muß das Signal bei 172.3 eher einem Lacton zugeordnet werden, dessen Sauerstoff mit einem quartären C-Atom verbunden ist.

Nun wurde überprüft, ob alle 6 Sauerstoffe entsprechenden C-Atomen zugeordnet werden konnten. Folgende Inkremente wurden gefunden: $>C=O$, $-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-O-\overset{|}{C}-$, , 3x $-\overset{|}{C}HO-$, also 7 Sauerstoff-Funktionen. Daraus folgt: $2\ >C<^{H}_{O-}$ Funktionen bilden zusammen eine Aetherbrücke im Terpenoidgerüst. Es verbleibt also $1\ >C<^{H}_{O-}$, das untergebracht werden muß, obwohl im ^{1}H-NMR keine OH-, keine Alkylaether- und keine Esterfunktion erkennbar ist. Ein Blick auf das ^{13}C-NMR von Toonacilin zeigt, daß

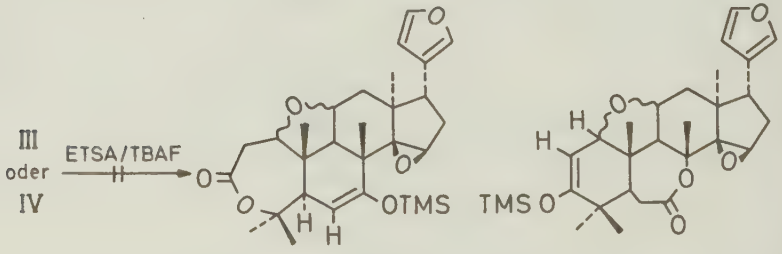
gruppe bei relativ tiefem Feld bei 1.38 ppm, die anderen sind zwischen 1.00 und 1.17 ppm im normalen Bereich.

Da aus Meliaceen bisher noch kein Triterpenoid mit Ring-B-Lactonstruktur isoliert worden ist, schien es mir angebracht, weitere chemische und spektroskopische Hinweise zu gewinnen, um die Struktur IV abzusichern.

h) Strukturhinweise durch chemische Umwandlungen

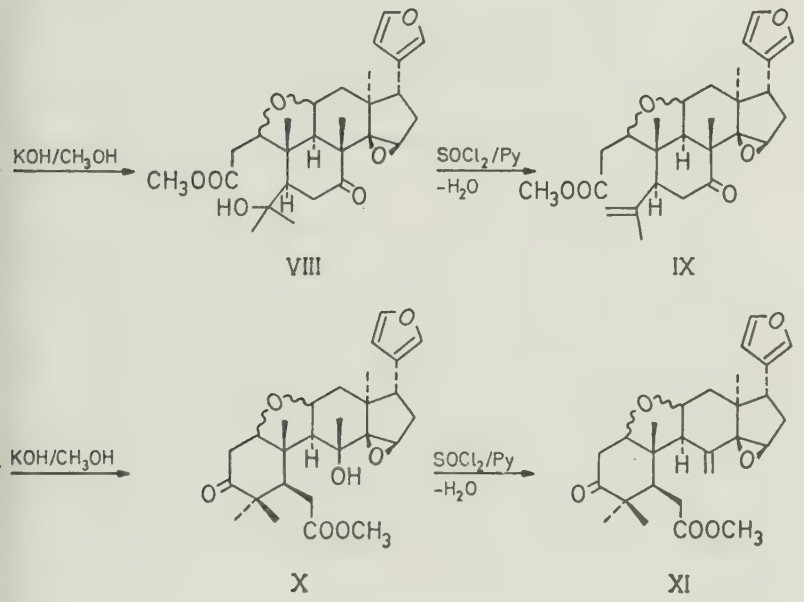
α) Versuch, die Oxogruppe selektiv in eine Trimethylsilylenolaethergruppe umzuwandeln

Es war beabsichtigt, III in VI oder IV in VII umzuwandeln, und damit ^{1}H-NMR-spektroskopisch zwischen III und IV entscheiden zu können. Im Falle der Struktur VI hätte ein neues AB-System im Spektrum erscheinen müssen, von dem zumindest das H^6-Dublett hätte sichtbar werden müssen. Im Falle der Struktur VII wäre das H^1-H^2-ABX-System von IV in ein im tiefen Feld gut sichtbares AB-System übergegangen.



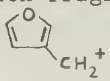
Das einzige, derzeit zur Verfügung stehende Reagens, das Ketone in Trimethylsilylenolaether umwandelt und dabei Lacton- und Epoxy-Funktionen unverändert läßt, ist ETSA/TBAF[77) 78)]. Trotz sorgfältiger Einhaltung der Reaktionsbedingungen ließ sich der Enolaether aus vermutlich sterischen Gründen nicht generieren. Das Ausgangsmaterial wurde quantitativ zurückerhalten.

Ringöffnung und Dehydratisierung zum seco-Tetranortriterpenoid



Lactonring von Toonafolin ließ sich mit Kaliumhydroxid in hanolischer Lösung öffnen, wobei die Carboxylgruppe gleich Methylestergruppe ungewandelt wurde, wie man leicht dem -NMR-Spektrum entnehmen konnte (δ = 3.68 ppm, s, 3H). Die nfalls gebildete tertiäre OH-Gruppe wurde im ^{1}H-NMR-Spekm durch D_2O-Austausch und im IR-Spektrum anhand der OHwingung bei 3475 cm^{-1} nachgewiesen. Obwohl IR- und ^{1}H-NMRktrum (im Methyl- und Methylenbereich) auch sonst starke erungen aufwiesen, konnte nicht eindeutig zugunsten einer beiden Strukturen VIII oder X entschieden werden.

h das Massenspektrum brachte keine eindeutigen Beweise. Es de versucht, Hinweise auf strukturrelevante Fragmente durch

D_2O-Austausch zu erhalten. Die durch Aufnahme des ^1H-NMR-Spe trums mit D_2O-Austausch verwendete Lösung in $CDCl_3$ eignete sich dafür nicht. Es wurde nur der M^+-Peak beobachtet. Wurde die Substanz aber in Aceton/D_2O gelöst, im MS-Tiegel eintrocknen gelassen und dann das MS aufgenommen, erhielt ich wie erwartet den M^+ und den M^++1-Peak, sowie eine Reihe von entsprechenden Fragment-Paaren, die jedoch leider nur den tr vialen Fragmenten wie M^+-CH_3, M^+-CH_3OH (aus dem Methylester) M^+-  und weiteren, aus dem Ring D stammenden Fragmen ten entsprachen.

Die Dehydratisierung mit $SOCl_2$ in Pyridin ergab nach schonen der Aufarbeitung und chromatographischer Reinigung mit 70pro Ausbeute ein Produkt, dessen ^1H-NMR-Spektrum eine Methylgruppe weniger, dafür aber eine exo-Methylengruppe (δ = 5.08 und 5.24 ppm), verbunden mit einer deutlichen Änderung der Kopplungskonstanten an H^{11} zeigte. Eine allylische Methylgruppe ist nicht zu beobachten. Daraus folgt, daß die exo-Methylengruppe die Position 8 einnimmt und der erzeugten Ver bindung die Struktur IX zukommt. Dies läßt den Schluß zu, da in Toonafolin der Ring B der Lactonring ist. Somit wird die Strukturannahme IV gefestigt.

i) 360 MHz - ^1H - NMR -Spektrum:

α) Einleitung:

Nachdem die Konstitution von Toonafolin (40) (Struktur IV) festlag, war es nötig, die Konfiguration des Moleküls, die j zunächst nur durch die Annahme der Biogenese über ein apo-Euphan-Skelett aufgestellt worden war, die Orientierung der 1,11-Aetherbrücke festzustellen und Hinweise auf die Konformation der flexiblen Ringe A und B zu gewinnen. Dafür mußten die 11 im Methylenbereich befindlichen Protonen identifizier werden. Die dafür erforderlichen ^1H-Entkopplungs- und NOE-Experimente wurden mit einem 360 MHz-NMR-Spektrometer aufgenom men, da nur so eine ausreichende Signalauflösung erzielt wer den konnte[55]. Die Entkopplungsexperimente sind im Spektrum von (40) graphisch dargestellt (Abb. 22). Der gespreizte Met lenbereich mit Zuordnung der Signale ist in Abb. 23 zu sehen

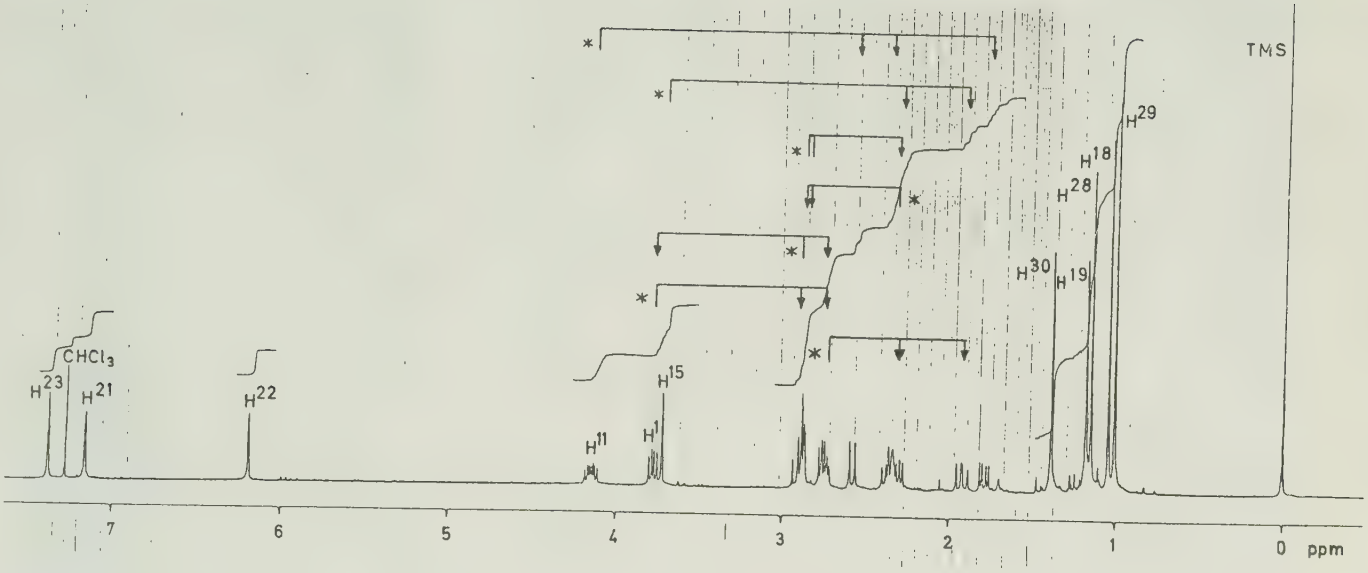


Abb. 22: ^{1}H-NMR-Spektrum von Toonafolin. 360 MHz-Aufnahme in $CDCl_3$. Die Einstrahlpunkte bei Entkopplungsexperimenten sind mit einem * gekennzeichnet.

D_2O-Austausch zu erhalten. Die durch Aufnahme des ^{1}H-NMR-Spektrums mit D_2O-Austausch verwendete Lösung in $CDCl_3$ eignete sich dafür nicht. Es wurde nur der M^+-Peak beobachtet. Wurde die Substanz aber in Aceton/D_2O gelöst, im MS-Tiegel eintrocknen gelassen und dann das MS aufgenommen, erhielt ich wie erwartet den M^+ und den M^++1-Peak, sowie eine Reihe von entsprechenden Fragment-Paaren, die jedoch leider nur den trivialen Fragmenten wie M^+-CH_3, M^+-CH_3OH (aus dem Methylester) M^+- und weiteren, aus dem Ring D stammenden Fragmenten entsprachen.

Die Dehydratisierung mit $SOCl_2$ in Pyridin ergab nach schonender Aufarbeitung und chromatographischer Reinigung mit 70proz Ausbeute ein Produkt, dessen ^{1}H-NMR-Spektrum eine Methylgruppe weniger, dafür aber eine exo-Methylengruppe (δ = 5.08 und 5.24 ppm), verbunden mit einer deutlichen Änderung der Kopplungskonstanten an H^{11} zeigte. Eine allylische Methylgruppe ist nicht zu beobachten. Daraus folgt, daß die exo-Methylengruppe die Position 8 einnimmt und der erzeugten Verbindung die Struktur IX zukommt. Dies läßt den Schluß zu, daß in Toonafolin der Ring B der Lactonring ist. Somit wird die Strukturannahme IV gefestigt.

i) 360 MHz - ^{1}H - NMR -Spektrum:

α) Einleitung:

Nachdem die Konstitution von Toonafolin (40) (Struktur IV) festlag, war es nötig, die Konfiguration des Moleküls, die ja zunächst nur durch die Annahme der Biogenese über ein apo-Euphan-Skelett aufgestellt worden war, die Orientierung der 1,11-Aetherbrücke festzustellen und Hinweise auf die Konformation der flexiblen Ringe A und B zu gewinnen. Dafür mußten die 11 im Methylenbereich befindlichen Protonen identifiziert werden. Die dafür erforderlichen ^{1}H-Entkopplungs- und NOE-Experimente wurden mit einem 360 MHz-NMR-Spektrometer aufgenommen, da nur so eine ausreichende Signalauflösung erzielt werden konnte[55]. Die Entkopplungsexperimente sind im Spektrum von (40) graphisch dargestellt (Abb. 22). Der gespreizte Methylenbereich mit Zuordnung der Signale ist in Abb. 23 zu sehen.

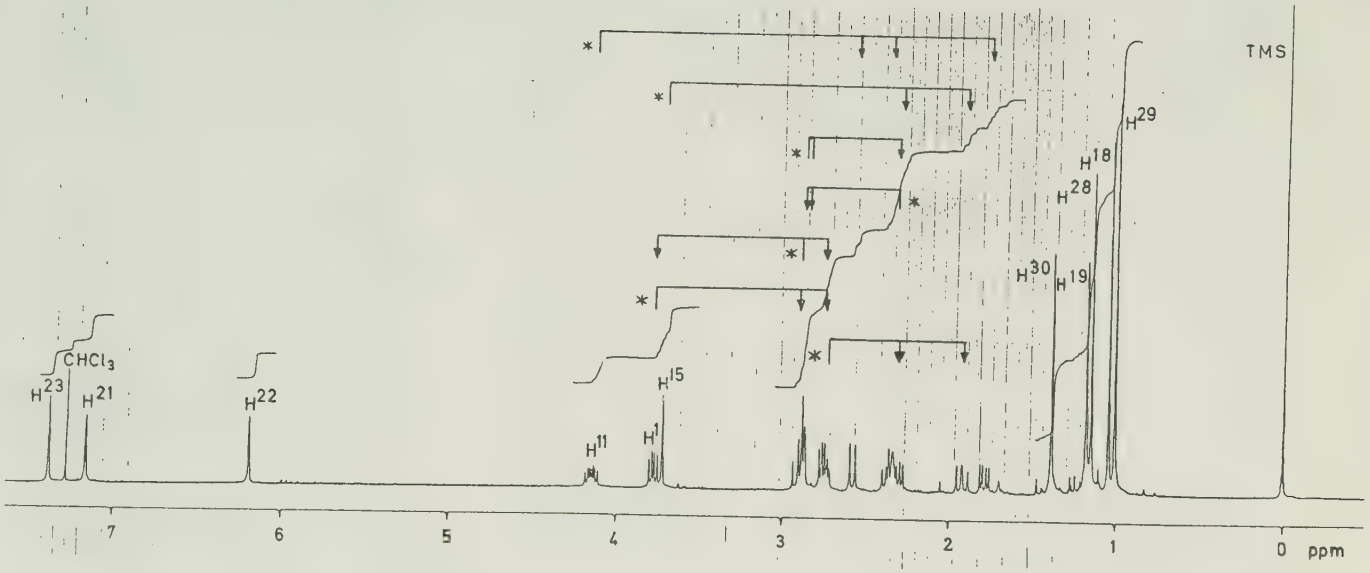
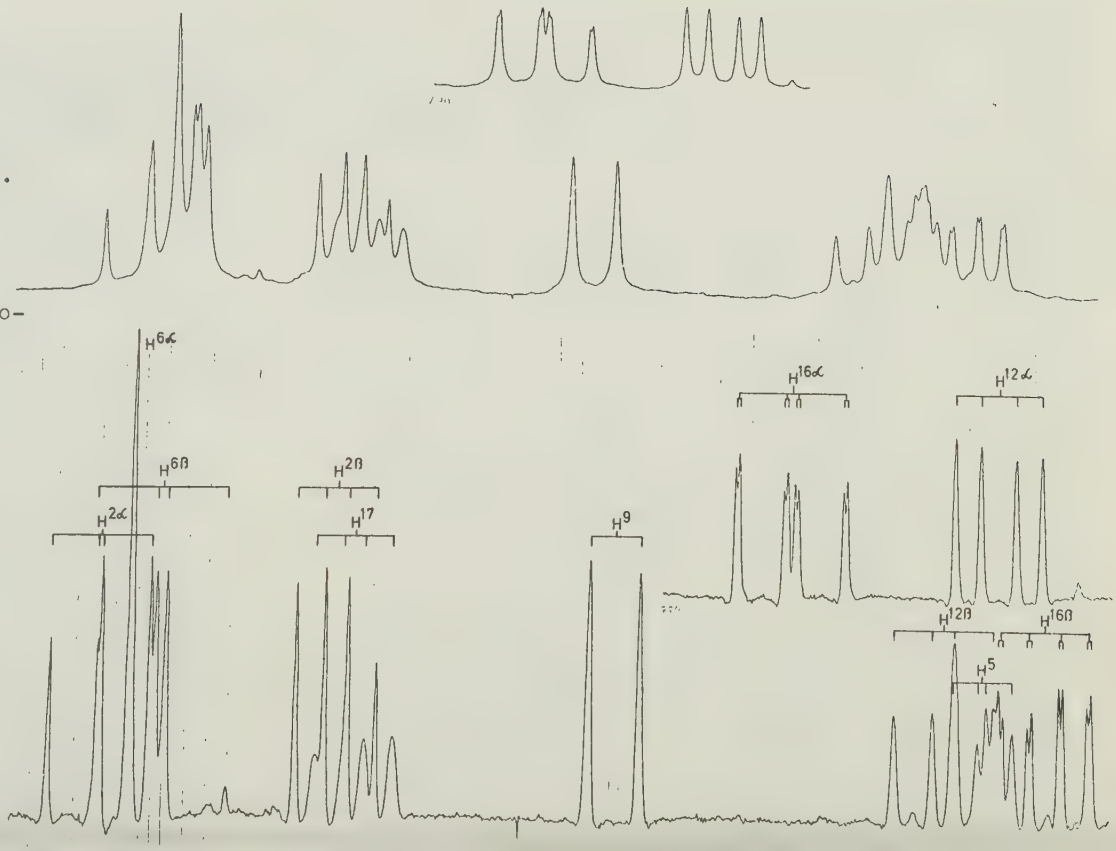


Abb. 22: ^{1}H-NMR-Spektrum von Toonafolin. 360 MHz-Aufnahme in $CDCl_3$. Die Einstrahlpunkte bei Entkopplungsexperimenten sind mit einem * gekennzeichnet.

Abb. 23:
^{1}H-NMR-Spektrum von Toonafolin. 360 MHz-Aufnahme in $CDCl_3$. Spreizung des Methylenbereichs. Oben normal, unten nach der "Convolution Difference" Methode berechnet.



Zur optimalen Auflösung der teilweise sehr dicht liegenden Signalgruppen wurde eine modifizierte "Convolution Difference"-Methode angewandt[79]. Bei dieser programmierten Methode wird der FID aufgenommen und doppelt gespeichert. Der eine FID wird exponentiell multipliziert[80] und die ersten drei Adressen =0 gesetzt. (Würde man mit dem exponentiell multiplizierten FID eine Fourier-Transformation durchführen, erhielte man oben schärfere, jedoch an der Basis verbreiterte Signale.) Dieser FID wird vom zweiten, der mit einem geeigneten Faktor multipliziert worden ist, abgezogen. Der Differenz-FID wird Fouriertransformiert. Man erhält so eine wesentlich schlankere Signalform und damit in komplizierten Spektren eine bessere Auflösung. Die Signale sind allerdings nicht integrierbar.

ß) Interpretation der Entkopplungsexperimente

Eingestrahlt auf H^1 (3.77 ppm):

AB-Teil $H^{2\alpha u.\beta}$ des ABX-Systems H^1-H^2 wird sichtbar. Außerdem wird das f_1-Signal des AB-Teils des ABX-Systems H^5-H^6, sichtbar, das vorher verdeckt war.

Die H^{15}-Frequenz wird mit eingestrahlt (3.70 ppm). Dadurch werden $H^{16\alpha u.\beta}$ identifizierbar, da die kleine H^{15}-H^{16}-Kopplung von 0.9 Hz wegfällt.

Eingestrahlt auf $H^{2\alpha}$ (2.90 ppm):

Hier wurde in den AB-Teil des ABX-Systems H^1-H^2 eingestrahlt, die Signale von $H^{2\beta}$ und H^1 werden als Dubletts sichtbar. Da H^{17} bei der Einstrahlung berührt wird, werden beide H^{16}-Protonen durch Teilentkopplung sichtbar. $CH_3{}^{18}$ wird durch Longrange-Entkopplung von H^{17} schlanker und höher.

Eingestrahlt auf H^5 (2.34 ppm):

Das enge AB-System der H^6-Protonen wird sichtbar. Da $H^{16\beta}$ von der Einstrahlung miterfaßt wird, verwandeln sich $H^{16\alpha}$ und H^{17} je in Dubletts.

Eingestrahlt auf $H^{6\alpha}$ (2.88 ppm):

$H^{6\beta}$ wird bei der Einstrahlung miterfaßt, daher wird H^5 zum Singulett. Außerdem wird $H^{2\beta}$ bei der Einstrahlung miterfaßt. was zu Teilentkopplungen bei H^1 und $H^{2\alpha}$ führt.

Eingestrahlt auf H^9 (2.58 ppm):

H^{11} wird entkoppelt, das H^{11}-Oktett wird zum X-Quartett des AMX-Systems H^{11}-H^{12}. Longrange-Kopplungen zu $CH_3{}^{19}$ oder $CH_3{}^{20}$ wurden nicht beobachtet.

Eingestrahlt auf H^{15} (3.70 ppm):

Die kleine Kopplung von 0.9 Hz zu $H^{16\alpha u.\beta}$ verschwindet. Dadurch wird die Zuordnung in der Gruppe $H^{12\beta}$, H^5, $H^{16\beta}$ klar.

Eingestrahlt auf H^{11} (4.14 ppm):

H^9 wird zu einem Singulett entkoppelt, $H^{12\ u.\beta}$ gehen in ein AM-System (2 Dubletts) über.

Eingestrahlt auf H^{17} (2.74 ppm):

$H^{16\alpha}$ und $H^{16\beta}$ werden zu je Dubletts entkoppelt. $H^{2\beta}$ wird bei der Einstrahlung noch miterfaßt, was eine Teilentkopplung bei $H^{2\alpha}$ bewirkt.

γ) Berechnung des ABX-Systems H^5-H^6_2:

Der AB- und der X-Teil des ABX-Systems sind in Abb. 24a dargestellt. Im AB-Teil sind die Abstände f_1 auf den linken äußeren Ast (tiefes Feld) f_1 = 0 Hz bezogen. Dessen Lage wurde von f_3/f_5 durch Subtraktion von J_{AB} = 14 Hz extrapoliert, denn da f_3 und f_5 fast zusammenfallen (f_5-f_3 wird in der folgenden Rechnung als = Null angenommen), muß nach der Theorie der AB-Systeme die Intensität von f_1 und f_7 ebenfalls fast = Null sein.

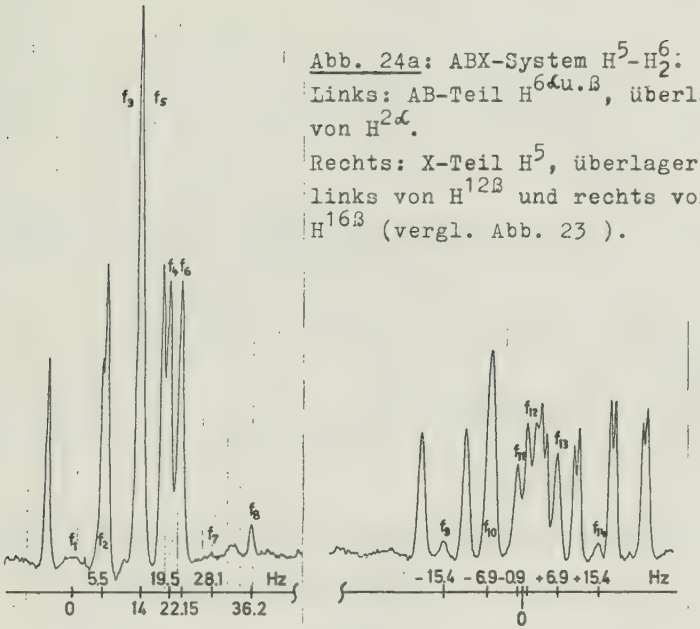


Abb. 24a: ABX-System H^5-H_2^6:
Links: AB-Teil $H^{6\alpha u.\beta}$, überlagert von $H^{2\alpha}$.
Rechts: X-Teil H^5, überlagert links von $H^{12\beta}$ und rechts von $H^{16\beta}$ (vergl. Abb. 23).

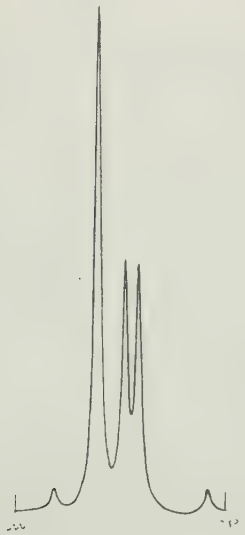


Abb. 24b: Computer Plot des AB-Teils nach den errechneten Werten für die chem. Verschiebungen und Kopplungskonstanten.

AB-Teilspektren: I: f_1, f_3, f_5, f_7
II: f_2, f_4, f_6, f_8

$J_{AB} = f_4 - f_2 = f_8 - f_6 = -14$ Hz

Bestimmung der Zentren Z der AB-Teilspektren:

$Z_I = 1/2\ (f_3+f_5) = 1/2\ (14+14) = 14$ Hz
$Z_{II} = 1/2\ (f_4+f_6) = 1/2\ (19.5+22.15) = 20.83$ Hz

Bestimmung der relativen chemischen Verschiebungen $[\nu_o\delta]$:

$[\nu_o\delta]_I = \sqrt{(f_5-f_3)\ (f_7-f_1)} = \sqrt{0 \cdot 28.1} = 0$ Hz
$[\nu_o\delta]_{II} = \sqrt{(f_6-f_4)\ (f_8-f_2)} = \sqrt{2.65 \cdot 30.7} = 9.02$ Hz

Effektive Larmorfrequenzen ν^*:

$\nu^*_{a_I} = Z_I - 1/2[\nu_o\delta]_I = 14-0 = 14$ Hz
$\nu^*_{b_I} = Z_I + 1/2[\nu_o\delta]_I = 14+0 = 14$ Hz
$\nu^*_{a_{II}} = Z_{II} - 1/2[\nu_o\delta]_{II} = 20.83-4.51 = 16.32$ Hz
$\nu^*_{b_{II}} = Z_{II} + 1/2[\nu_o\delta]_{II} = 20.83+4.51 = 25.34$ Hz

Lösung 1:

$J_{AX} = \nu^*_{a_{II}} - \nu^*_{a_I} = 16.32-14 = 2.32$ Hz
$J_{BX} = \nu^*_{b_{II}} - \nu^*_{b_I} = 25.34-14 = 11.34$ Hz
$\nu_A = \nu^*_{a_I} + 1/2J_{AX} = 14+1.16 = 15.16$ Hz
$\nu_B = \nu^*_{b_I} + 1/2J_{BX} = 14+5.67 = 19.67$ Hz

Lösung 2:

$J_{AX} = \nu^*_{b_{II}} - \nu^*_{a_I} = 25.34-14 = 11.34$ Hz
$J_{BX} = \nu^*_{a_{II}} - \nu^*_{b_I} = 16.32-14 = 2.32$ Hz
$\nu_A = \nu^*_{a_I} + 1/2J_{AX} = 14+5.67 = 19.67$ Hz
$\nu_B = \nu^*_{b_I} + 1/2J_{BX} = 14+1.16 = 15.16$ Hz

Auswahl der richtigen Lösung:

In diesem Spezialfall, wo $\nu^*_{a_I} = \nu^*_{b_I}$ ist, wird für beide Lösungen $|\nu_A - \nu_B|$ gleich, das heißt, Lösung 2 ist das Spiegelbild von Lösung 1. Zur Unterscheidung zwischen beiden Lösungen wären die Intensitäten im X-Teil des Spektrums auszuwerten[58a], was jedoch wegen der Überlagerung mit anderen Signalen nicht gelingt. Die Computer-Zeichnung[81] (Abb.24b) meiner berechneten Daten weist Lösung 1 als die Richtige aus. Da die geminale Kopplungskonstante negativ sein muß, muß ihr J_{AB}, d.h. $J_{H^{6\alpha}-H^{6\beta}} = -14$ Hz zugeordnet werden, denn die beiden berechneten Kopplungskonstanten $J_{AX} = +2.32$ Hz und $J_{BX} = +11.34$ Hz haben gleiches Vorzeichen. Sie werden daher den vicinalen Kopplungen zugeordnet, wobei J_{AX} zur Kopplung $H^{5\alpha}H^{6\alpha}$ (syn-clinale Anordnung) und J_{BX} zur Kopplung $H^{5\alpha}-H^{6\beta}$ (anti-periplanare Anordnung) gehört. Die Konfiguration an C^5 wurde den NOE-Experimenten entnommen (siehe VI, 2.),i),η).

Als relative chemische Verschiebungen wurden ermittelt:

$\nu_A = \nu_{H^{6\alpha}} = 15.16$ Hz
$\nu_B = \nu_{H^{6\beta}} = 19.67$ Hz
$\nu_X = 194.40$ Hz (Zentrum des X-Teils)

Bezieht man diese Abstände auf $f_{3/5} = 14$ Hz, so wird $\nu_A = 1.16$ Hz = 0.003 ppm, $\nu_B = 5.67$ Hz = 0.015 ppm und $\nu_X = 194.4$Hz = 0.54 ppm.

Ermittlung der chemischen Verschiebungen δ:

ν_A ist praktisch = $f_{3/5}$. Dessen chem. Verschiebung δ wurde dem Spektrum zu 2.88 ppm entnommen. Man erhält damit das folgende Ergebnis: $\delta_{H^{6\alpha}} = 2.88$ ppm
$\delta_{H^{6\beta}} = 2.88-0.02 = 2.86$ ppm
$\delta_{H^5} = 2.88-0.54 = 2.34$ ppm

Zur Konfiguration und Konformation des Ringes B:

Die Orientierung der H^5 und H^6-Protonen zueinander ist durch die vicinalen Kopplungskonstanten mit Hilfe der Karplus-Gleichung[50] zu erhalten (siehe oben). Darüberhinaus kann man

über die Orientierung der beiden H^6-Protonen zur Lactoncarbonylgruppe[82] eine wichtige Aussage zu deren Konformation machen. Da die Lactongruppe ($-C^6-C^7(=O)-O-C^8-$) planar und die C-Atome 8, 9, 10 und 5 im Gerüst starr verankert sind, ist für den Lactonring eine relativ spannungsarme Sesselkonformation und, weniger wahrscheinlich, eine gespannte Envelop-Konformation denkbar. In der ersteren sind die H^6-Protonen zur Carbonyl-π-Bindung wie in a), in der letzteren wie in b) angeordnet (Abb. 25). Für die Anordnung erwartet man eine geminale Kopplungskonstante von $^2J = -12$ bis -14 Hz, für b dagegen $^2J = -16$ bis -18 Hz.

Abb. 25:

a b

Gefunden wurde $^2J = -14$ Hz, das heißt, der Lactonring B liegt in der Sesselkonformation vor. (Vergl. VI. 7.), c)).

δ) Berechnung des ABX-Systems $H^1-H_2^2$ (Abb. 26):

Die Berechnung dieses Systems wurde wie unter γ) beschrieben durchgeführt. Dabei wurden folgende Ergebnisse erhalten (die Ergebnisse der Auswertung des X-Teils nach den Regeln der 1. Ordnung sind in Klammern hinzugefügt):

$J_{AB} = -12$ Hz, dem Spektrum entnommen (f_3-f_1 oder f_4-f_2)
$J_{AX} = +11.2$ Hz (10.8 Hz)
$J_{BX} = +6.4$ Hz (6.5 Hz)

Man sieht, daß dieses System $\left(\frac{J_{AX}}{\nu_B-\nu_A} = \frac{11.16}{52.64} = 0.21\right)$ an der Grenze zum AMX-System liegt und noch ohne große Fehler nach den Regeln 1. Ordnung ausgewertet werden kann.

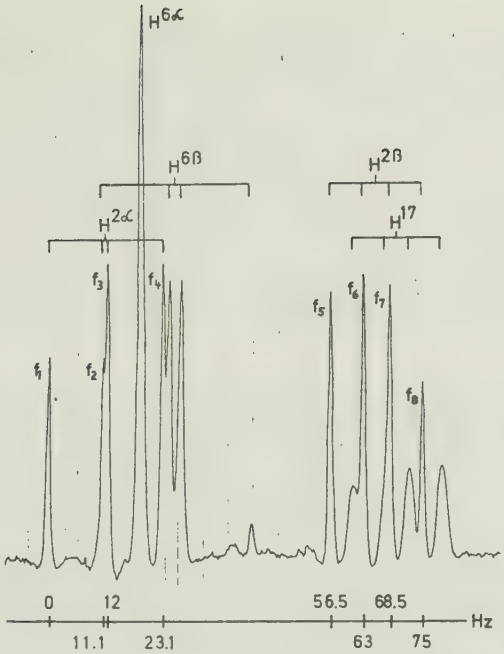


Abb. 26: AB-Teil des ABX-Systems H^1-H^2_2.

Nach Bestimmung der Konfiguration an C^1 durch NOE-Experimente (siehe VI., 2.), i), η) und der Konformation aus dem CD-Spektrum, kann der großen vicinalen Kopplungskonstanten ^3J = +11.2 Hz die Kopplung zwischen $H^{1\beta}$ und $H^{2\alpha}$ (antiperiplanare Anordnung) zugeordnet werden, ^3J=+6.4Hz entspricht dann der Kopplung zwischen $H^{1\beta}$ und $H^{2\beta}$ (synclinale Anordnung).

Auf Grund dieser Zuordnung konnten die chemischen Verschiebungen ebenfalls wie folgt zugeordnet werden:

$\delta_A = \delta_{H^{2\alpha}} = 2.90$ ppm
$\delta_B = \delta_{H^{2\beta}} = 2.75$ ppm
$\delta_X = \delta_{H^{1\beta}} = 3.77$ ppm (Zentrum des X-Teils)

ε) Auswertung des AMXY-Systems H^9-H^{11}-H^{12}_2

Die Konfiguration an C^9, C^{11} und C^{12} wurde durch NOE-Experi-

mente ermittelt. $J_{XY} = J_{H^9} — {}_{H^{11\beta}} = 11.8$ Hz. Die beiden H-Atome stehen antiperiplanar. Die Kopplungskonstante mit dem größten Wert ist die geminale: $J_{AM} = J_{H^{12\alpha}}{}_{u.\beta} = -14$ Hz. $H^{11\beta}$ und $H^{12\beta}$ stehen synperiplanar; ihnen wird daher $J_{AX} = 8.8$ Hz zugeordnet. $H^{11\beta}$ und $H^{12\alpha}$ stehen anticlinal, wofür $J_{MX} = 5.8$ Hz paßt. Die δ-Werte von $H^{12\alpha}$ (1.79 ppm) und $H^{12\beta}$ (2.37 ppm) konnten sowohl über die Kopplungskonstanten, als auch über NOE-Experimente gewonnen werden. δ_{H^9} (2.58 ppm) und $\delta_{H^{11}}$ (4.14 ppm) wurden durch Entkopplungsexperimente bereits bestimmt.

ζ) Auswertung des AMXY-Systems H^{15}, $H_2{}^{16}$, H^{17}:

Die Konfiguration an C^{15} und C^{17} folgte aus NOE-Experimenten. H^{15} (hier Y-Proton) konnte wegen seiner charakteristischen chem. Verschiebung ($\delta = 3.70$ ppm) und seiner Kopplung zu beiden H^{16}-Protonen identifiziert werden: $J_{AY} = J_{MY} = J_{H^{15}-H^{16}} = 0.9$ Hz. H^{17} liegt als X-Proton fest wegen seiner typischen chem. Verschiebung ($\delta = 2.74$ ppm) und der Linienverbreiterung durch Longrangekopplung zu den Furanprotonen. Dem AMX-Teil wurden folgende J- und δ-Werte entnommen:

$J_{AM} = J_{H^{16\alpha+\beta}} = -13.6$ Hz
$J_{AX} = J_{H^{16\beta}-H^{17}} = 6.5$ Hz
$J_{MX} = J_{H^{16\alpha}-H^{17}} = 11.1$ Hz
$\delta_{H^{16\alpha}} = 1.92$ ppm identifiziert durch NOE von $CH_3{}^{19}$
$\delta_{H^{16\beta}} = 2.30$ ppm

Eine Übersicht über die Signalzuordnung und die Kopplungskonstanten gibt Tabelle 11.

η) NOE-Experimente

Es wurden qualitative, aber genügend aussagekräftige Ergebnisse mit einer nicht entgasten Probe durch Anwendung der NOE-Differenzmethode[83] erzielt. Bei diesem Programm werden jeweils zwei scans ohne und zwei scans mit f_2-Einstrahlung aufgenommen. Der letzte FID wird um 180° gedreht und zum

Tabelle 11: ^{1}H-NMR-Daten von Toonafolin (40). 360 MHz-Aufnahme in $CDCl_3$. δ-Werte bez. auf TMS = 0

H-Atom	δ (ppm)	Spinsystem (Multiplizität)	Kopplungskonstanten (Hz)
1	3.77	ABX (X-Teil)	J_{AX}= 11.2, J_{BX}= 6.4
2 α	2.90	ABX (A-Teil)	J_{AB}=-12 , J_{AX}=11.2
2 β	2.75	ABX (B-Teil)	J_{AB}=-12 , J_{BX}= 6.4
5	2.34	ABX (X-Teil)	J_{AX}= 2.3, J_{BX}=11.3
6 α	2.88	ABX (A-Teil)	J_{AB}=-14 , J_{AX}= 2.3
6 β	2.86	ABX (B-Teil)	J_{AB}=-14 , J_{BX}=11.3
9	2.58	AMXY (Y-Teil)	J_{XY}= 11.8
11	4.14	AMXY (X-Teil)	J_{AX}= 8.8, J_{MX}= 5.8, J_{XY}=11.8
12 α	1.79	AMXY (M-Teil)	J_{AM}=-14 , J_{MX}= 5.8
12 β	2.37	AMXY (A-Teil)	J_{AM}=-14 , J_{AX}= 8.8
15	3.70	AMXY (Y-Teil)	J_{AY}=J_{MY}=0.9
16 α	1.92	AMXY (M-Teil)	J_{AM}=-13.6, J_{MX}=11.1, J_{MY}= 0.9
16 β	2.30	AMXY (A-Teil)	J_{AM}=-13.6, J_{AX}= 6.5, J_{AY}= 0.9
17	2.74	AMXY (X-Teil)	J_{AX}= 6.5, J_{MX}=11.1
18-CH_3	1.04	(s)	
19-CH_3	1.17	(s)	
21	7.15	(m)	
22	6.17	(m)	
23	7.38	(d,d)	
28-CH_3	1.14	(s)	
29-CH_3	1.00	(s)	
30-CH_3	1.38	(s)	

ersteren addiert. Dies wird so oft wie gewünscht wiederholt. im vorliegenden Fall 6 mal, dann wird der addierte FID nochmals um 180° gedreht und dann Fourier-transformiert. Man erhält so ein Spektrum, bei dem alle Signale, die keinen NOE-Effekt erfahren haben, verschwunden sind. Signale mit NOE-Effekt sind als aufrechte Peaks zu sehen; dort wo die f_2-Frequenz eingestrahlt wurde, erscheint ein negativer Peak.

Es wurden alle 5 Methylgruppen eingestrahlt und folgende Ergebnisse erhalten:

Tabelle 12: NOE-Experimente (s = stark, m = mittel
w = schwach, vw = sehr schwach)

f_2 eingestr. auf	NOE beobachtet bei
$CH_3$18	H^9 (s)
$CH_3$19	H^1 (s), H^{11} (w), H^6 (m), H^{29} (s), H^{30} (
$CH_3$28	H^5 (w), $H^{6\beta}$ (w), H^{29} (s)
$CH_3$29	H^6 (vw)
$CH_3$30	H^{15} (s), H^{19} (m)

Damit konnten die fünf Methylgruppen den entsprechenden chem. Verschiebungen zugeordnet und die Konfiguration an allen C-Atomen bestimmt werden. Toonafolin kommt daher die Struktur (40) zu.

3.) Interpretation des ^{13}C-NMR-Spektrums (Abb. 21):

Die Zuordnung der ^{13}C-NMR-Signale der C-Atome 3, 7 u. 20-22 konnte leicht aufgrund der typischen chemischen Verschiebungen gemacht werden. Die übrigen Signale wurden durch 10 selektive ^{13}C-^{1}H-Entkopplungsexperimente vollständig zugeordnet. Die eingestrahlten ^{1}H-Frequenzen sind im ^{1}H-NMR-Spektrum von (40) in Abb. 27 eingezeichnet.

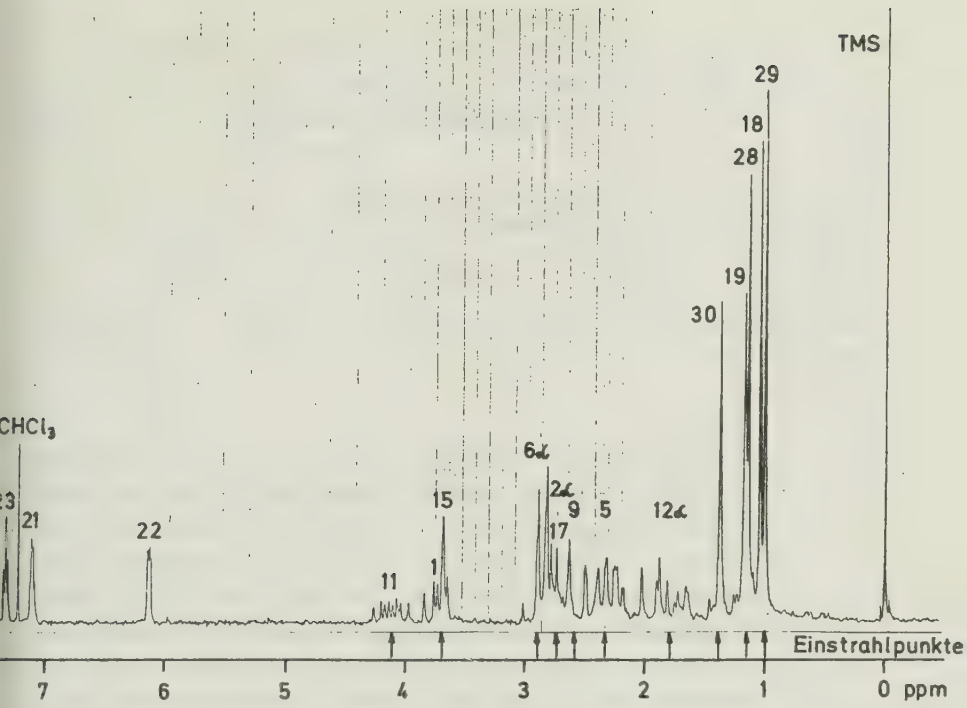


Abb. 27: Einstrahlpunkte bei der selektiven ^{1}H-^{13}C-Entkopplung von Toonafolin.

Beschreibung der einzelnen Entkopplungsexperimente:

Entkopplung: s = stark, m = mittel, w = schwach
Residualkopplung: d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett
Reihenfolge der beobachteten ^{13}C-Signale mit zunehmender Residualkopplung entsprechend der Entfernung der betreffenden ^{1}H-Signale vom Einstrahlpunkt:

Eingestr. ^{1}H-Frequenz: CH_3^{29} (1.00 ppm):

Beobachtete ^{13}C-Signale:
C^{29} (s)
C^{18} (m)
C^{28} (w) schlanker
C^{19} (w) breiter
C^{30} (q) nur die beiden mittleren Äste waren sichtbar

Bei allen anderen Signalen, ausser bei der eng stehenden Gruppe zwischen 42.0 und 42.4 ppm, konnte die Multiplizität aller ^{1}H-^{13}C-Kopplungen festgestellt werden.

Eingestr. ^{1}H-Frequenz: $CH_3{}^{28}$ (1.14 ppm):

Beobachtete ^{13}C-Signale:
C^{28} (s)
C^{19} (m)
C^{18} (m) } hier nicht zu unterscheiden
C^{29} (q)
C^{30} (q)

C^{3} (s) wird intensiver. Einziger Grund kann ein ^{1}H-^{13}C-NOE[61] von $CH_3{}^{28}$ sein. Das stützt die Annahme, daß die Oxogruppe im Ring A sitzt. Der NOE ist offenbar bei Einstrahlung der Frequenz der äquatorialen $CH_3{}^{28}$-Gruppe größer als bei Einstrahlung der axialen $CH_3{}^{29}$-Gruppe. Störungen von anderen Methylgruppen sollten wegen zu großer räumlicher Distanz nicht zu erwarten sein, ebensowenig ein NOE von H^6, da hier der Abstand der eingestrahlten Frequenz zu groß ist.

C^{4} (s) ist hier, wie auch bei Einstrahlung von C^{29} gegenüber den im folgenden beschriebenen Spektren intensiver wegen Longrange-Entkopplung.

Eingestr. ^{1}H-Frequenz: $CH_3{}^{30}$ (1.38 ppm):

Beobachtete ^{13}C-Signale:
C^{30} (s)
C^{19} (w)

C^{28} (q) nur als (d) erkennbar
C^{18} (q)
C^{29} (q)

C^{8} (s) wird intensiver im Vergleich mit C^{14} (s) durch Longrange-Entkopplung. Dadurch und durch Vergleich von $\delta_{C}14$ mit dem Wert von Toonacilin werden beide Signale

sicher zugeordnet.

Eingestr. ^{1}H-Frequenz: $H^{12\alpha}$ (1.79 ppm)

Beobachtete ^{13}C-Signale:
Entkoppelt wurden die Tripletts von C^{12} und C^{16}. Da nur auf $H^{12\alpha}$ eingestrahlt wurde (dabei wird $H^{16\alpha}$ mitentkoppelt, denn die Zentren der AM-Teile der beiden AMX-Systeme liegen nur 0.03 ppm auseinander), wird C^{12} zu einem breiten Singulett entkoppelt, ebenso C^{16}. Das Signal von C^{12} hat eine Halbwertsbreite von 9.9 Hz, das von C^{16} von 10.9 Hz. Darauf beruht die Zuordnung.

Bei dieser Einstrahlung werden auch die Multiplizitäten der drei eng beisammenliegenden Signale bei δ = 42.0, 42.2 und 42.4 ppm sichtbar; sie sind in dieser Reihenfolge (t), (d) und (s).

Die Unterscheidung zwischen (d) und (t) konnte dadurch getroffen werden, daß der Abstand zwischen (s) und (t) im Vergleich mit dem PND-Spektrum konstant blieb (beidesmal 8.824 Hz). Das zusätzliche Signal ist dann ein Ast von (d), dessen anderer von (s) überlagert wird.

Das Triplett bei 42.0 ppm wird C^{2} zugeordnet, denn es ist von den beiden verbliebenen "Residual-Tripletts" das schlankere. Das breitere, noch komplex weiter aufgespaltene Residualtriplett kann so C^{6} zugeordnet werden.

(s) kann zu C^{10} oder C^{13} gehören, (d) ist vermutlich das Dublett von C^{17}.

Zwischen C^{5} und C^{9} kann hier anhand der Residualkopplung gut unterschieden werden.

Eingestr. ^{1}H-Frequenz: H^{5} (2.34 ppm):

Beobachtete ^{13}C-Signale:

C^{5} (s)
C^{9} (s) } sind bei Einstr. auf H^{12} besser zu unterscheiden

C^{12} (m) beginnende Aufspaltung

C^{17} (m) " " , kann dem Dublett bei 42.2 ppm zugeordnet werden.

C^{10} (s) intensiver durch Longrange-Entkopplung

C^{13} (s) als verbleibendes quartäres C-Atom zugeordnet

C^{7} (s) wesentlich intensiver im Vergleich mit den vorigen Entkopplungsversuchen. Möglicherweise NOE von H^{5} und H^{9}, störende Frequenzen von anderen H-Atomen sind nicht in diesem Bereich. Ein NOE könnte hier nur auftreten, wenn der Ring B die Sesselkonformation einnimmt. Dadurch ist die C^{7}=O-Gruppe H^{5} und H^{9} zugeneigt. Die Sesselkonformation des Ringes B ist durch die Kopplungskonstanten von H^{5} und H^{6} sowie durch die Auswertung des CD-Spektrums gesichert.

Eingestr. ^{1}H-Frequenz: H^{9} (2.58 ppm):

Beobachtete ^{13}C-Signale:

C^{9} (s) Wichtige Selektiventkopplung, da δ_{C9} zwischen den δ-Werten der C-Atome mit Aetherfunktion liegt, und damit von diesen unterschieden werden kann.

C^{5} (m)
C^{17} (m)
C^{2} (w)
C^{6} (w)
C^{12} (t)
C^{16} (t)

C^{10} (s) intensiver durch Longrange-Entkopplung

C^{7} (s) intensiver durch NOE (vergl. Einstr. H^{5})

Eingestr. ^{1}H-Frequenz:	Beobachtete ^{13}C-Signale:	
H^{17} ($H^{2\alpha}$) (2.74 ppm)	C^{17} (s)	
	C^{2} (s)	
	C^{6} (m)	
	C^{9} (m)	
	C^{5} (w)	
	C^{12} (t)	
	C^{16} (t)	
$H^{6\alpha}$ (2.88 ppm, liegt in der Mitte zw. $H^{2\beta}$ und $H^{6\beta}$)	C^{6} (s)	
	C^{2} (s)	
	C^{17} (s)	
	C^{9} (m)	
	C^{5} (d)	
	C^{12} (t)	
	C^{16} (t)	
	C^{7} (s)	intensiver durch Longrange-Entkopplung
H^{15} (3.70 ppm)	C^{15} (s)	Sichere Unterscheidung der
	C^{1} (m)	C-Atome mit Aetherfunktionen
	C^{11} (d)	" "
H^{11} (4.14 ppm)	C^{11} (s)	" "
	C^{1} (m)	" "
	C^{15} (d)	" "

Durch diese Entkopplungsexperimente konnten alle 26 ^{13}C-Signale den entsprechenden C-Atomen zugeordnet werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 28 zusammengefaßt.

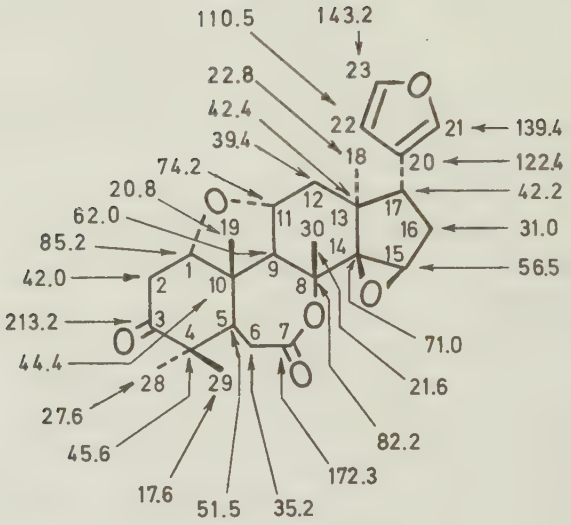


Abb. 28: ^{13}C-NMR-Daten von Toonafolin (δ, ppm bez. auf TMS = 0, Lösungsmittel $CDCl_3$).

4.) Interpretation des Massenspektrums:

Die Interpretation des Massenspektrums (Abb. 29) geht aus der Skizze (Abb. 30) hervor. m/e: 440 (M^+-Peak), 425 (M^+-CH_3), 422 (M^+-18), 407 (M^+-18-15). Die letzten beiden Fragmente weisen wegen ihrer kleinen Intensität nicht auf eine OH-Gruppe hin, sondern sind einfach als O-Indikatoren aufzufassen

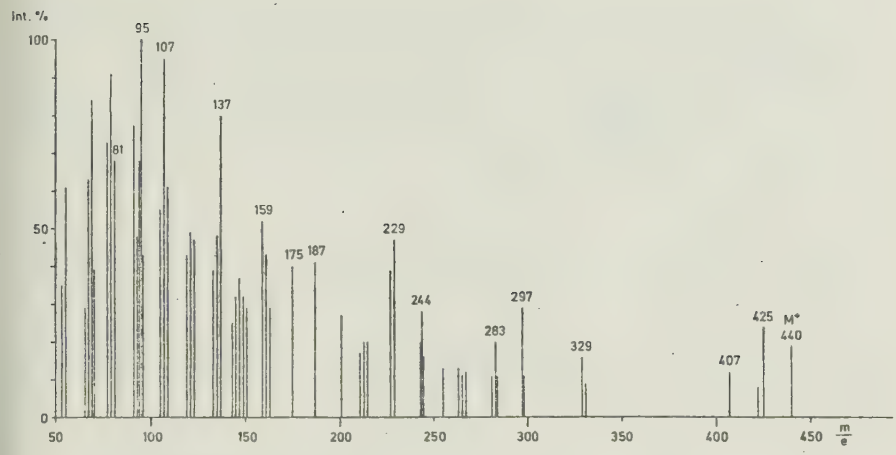


Abb. 29: Massenspektrum von Toonafolin. Elektronenenergie: 70 eV, Jonenquellentemperatur: 460° K.

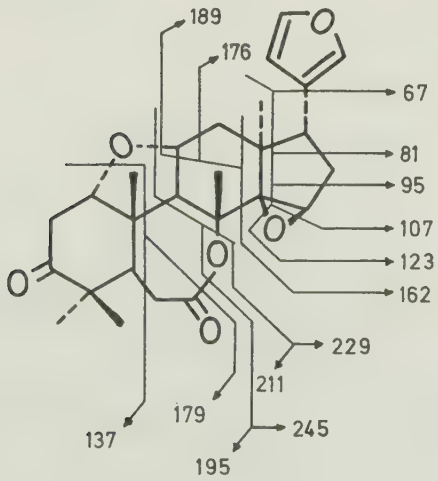


Abb. 30: Fragmentierungsschema zum Massenspektrum von Toonafolin.

5.) Interpretation des Infrarotspektrums (Abb. 31)[63)64)65)]

st = stark, m = mittel, s = schwach, ss = sehr schwach
ν = Streckschwingung, δ = Deformationsschwingung (oop = out of plane, s = symmetrisch, as = asymmetrisch) ω = Gerüstschwingung. Aufgenommen in KBr.

Frequenz [cm^{-1}]	Int.	Interpretation
3133	ss	ν, C-H, Furan
3025	s	ν, C-H, Epoxid
2960	m	ν_s, C-H, CH_3-
2942	m	ν_{as}, C-H, -CH_2-
2890	s	ν, C-H, -CH-
2870	s	ν_{as}, C-H, CH_3-
1718	st	ν, C=O, Lacton und 6-Ring-Keton
1505	s	ν, C-O-C, Furan
1460	m	δ_s, C-H, -CH_2-
1450	m	δ_{as}, C-H, CH_3-
1398	m	δ_s, C-H, CH_3-Aufspaltg. gibt Hinweis auf $>C(CH_3)_2$ - Gruppe
1387	m	
1270	st	ν_s, (C-O-C) Epoxid
1200	m	ω, $>C(CH_3)_2$
1178	m	ν_{as}, (C-C(=O)-O), Lacton
1168	m	ν_{as}, O-CH_2-C, Lacton
1128	m	ω, unbestimmt, vermutlich Kohlenstoff gerüstschwingung
1086	st	ν_{as}, C-O-C, Tetrahydrofuranring
1028	st	ω, Unbestimmt, vermutlich Kohlenstoff gerüstschwingung
961	m	ω, " "
928	s	ν_s, C-O-C, Tetrahydrofuranring
880	m	δ_{oop}, C-H, Furan
826	s	ν_s, C-O-C, Epoxidring
602	m	

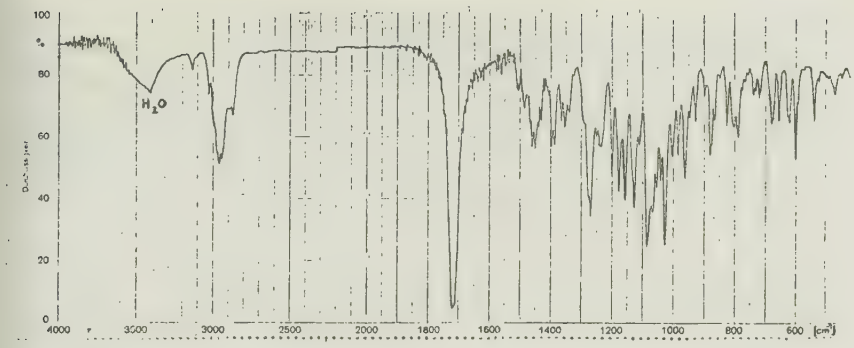


Abb. 31: IR-Spektrum von Toonafolin, aufgenommen in KBr.

Abb. 32: UV-Spektrum von Toonafolin. $E = \lg \frac{I_o}{I}$, c = 1.17 mMol/l in Acetonitril, d = 2 cm.

6.) Interpretation des UV-Spektrums (Abb. 32)

Die Bande bei 285 nm (ε_{max} = 64) ist dem verbotenen $n \rightarrow \pi^*$-Übergang des 6-Ring-Ketons zuzuordnen. Von einer zweiten Bande mit Schwingungsfeinstruktur ist das Maximum nicht mehr zu sehen. Es liegt nach CD bei 210 nm und ist dem $n \rightarrow \pi^*$-Übergang der Lacton-Carbonylgruppe zuzuordnen.

7.) Interpretation des CD-Spektrums (Abb. 33)[53]

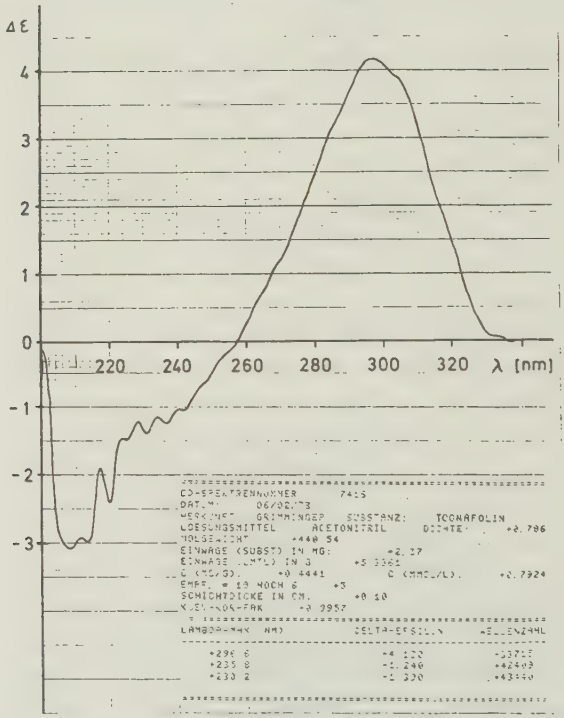


Abb. 33: CD-Spektrum von Toonafolin, aufgenommen in Acetonitr

a) Einleitung

Der CD für den Ketochromophor ist $\Delta\varepsilon$ = +4.13 (297 nm), der für das Lacton $\Delta\varepsilon \approx -3$ (210 nm).

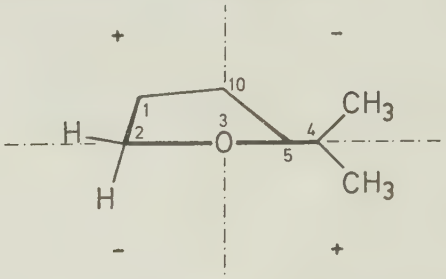
Diese Daten stellen nun endgültig sicher, daß der Ring B zum Lacton erweitert ist und die Ketogruppe im Ring A sitzt. Wäre es umgekehrt, das heißt, wäre die Ketogruppe im Ring B, so käme dafür nur eine Sesselkonformation in Frage. Der CD läge dann unter +1, wahrscheinlich aber im negativen Bereich. Zum Beispiel liegt der CD von Nomilin (15) bei $\Delta\varepsilon = -2.21$.[84)]

Für Tetranortriterpenoide mit einem 3-Ketocarbonyl in Ring A und einem 7-Lactoncarbonyl in Ring B gibt es in der Literatur kein Beispiel. Das Dreiding-Modell von Toonafolin (40) zeigt, daß der Ring A durch die 1,11-Aetherbrücke in eine Twistkonformation gezwungen wird. Das bedeutet, daß die zweite Sphäre bezogen auf den Carbonylchromophor achiral wird.[85)86)]

b) Die Konformation des Ringes A:

Die Oktantenregel, die für Cyclohexanone in der Sessel- oder Bootkonformation (C_s-Symmetrie) entwickelt worden ist, kann hier nicht angewandt werden, da Vorzeichen und Betrag des CD bei der Twistkonformation überwiegend von der Orientierung der Substituenten der beiden C_α-Atome bestimmt werden. Die relativ große Kopplungskonstante zwischen H^1 und H^2 von ^3J = 11.8 Hz im ^{1}H-NMR und die relativ kleine geminale Kopplungskonstante von ^2J = -12 Hz erlauben für Ring A zwei Twistkonformationen: Eine, bei der H^1 und $H^{2\alpha}$ antiperiplanar (Konformation III in Abb. 34) oder eine, bei der H^1 und $H^{2\beta}$ synperiplanar (Konformation VI in Abb. 35) stehen. Der CD von Toonafolin (40) für den Ketocarbonylchromophor wurde nach der Methode von Kirk[87)] für verschiedene Konformationen, einschließlich der extremen Halbsessel- und Halbbootkonformationen berechnet. Die Rechnung wird hier am Beispiel der am wahrscheinlichsten zutreffenden Konformation III (Abb.34) ausgeführt. Die Ergebnisse aller Berechnungen sind in Abb.35 graphisch dargestellt.

Abb. 34: Konformation III des Ringes A in Toonafolin (40).



Berechnung des CD der abgeflachten Twistkonformation III (C^3, C^4, C^5 in einer Ebene).

$$(\delta\Delta\varepsilon)_{C-3,2,1} = k_{CH_2}\sin^2\omega - k_H \sin^2(\omega+120^\circ) + k_H \sin^2(\omega-120^\circ)$$
$$= -1.9 \sin^2 150^\circ + 6.2 \sin^2 270^\circ - 6.2 \sin^2 30^\circ$$
$$= -0.48 + 6.2 - 1.55 = 4.17$$

$$(\delta\Delta\varepsilon)_{C-3,4,5} = k_C \sin^2\omega - k_{Me} \sin^2(\omega+120^\circ) + k_{Me} \sin^2(\omega-120^\circ)$$
$$= -4.3 \sin^2 180^\circ + 4.3 \sin^2 300^\circ - 4.3 \sin^2 60^\circ$$
$$= 0 + 3.23 - 3.23 = 0$$

$$\Delta\varepsilon = (\delta\Delta\varepsilon)_{C-3,2,1} + (\delta\Delta\varepsilon)_{C-3,4,5} = \underline{\underline{4.17}}$$

Die $\Delta\varepsilon$-Werte setzen sich nach Kirk[87] additiv aus den beiden Beiträgen $\delta\Delta\varepsilon$ der links und rechts vom Carbonylchromophor stehenden C_α-Atome zusammen. Folgende Formel wurde der Berechnung zugrundegelegt:

$$\delta\Delta\varepsilon = \sum_i k_i \sin^2\omega_i$$

Folgende Konstanten k_i wurden verwendet:

k_{CH_2} = -1.9 für eine $CH_{2\alpha}$-C_β-Bindung
k_C = -3.4 für eine C_α-C_β-Bindung
k_{Me} = -3.4 für eine C_α-CH_3-Bindung
k_H = -6.2 für eine C_α-H-Bindung

Die Torsionswinkel ω_i für die C_α-C_β-Bindung, von der Carbonylgruppe aus im Uhrzeigersinn gesehen, wurden Dreiding-Modellen entnommen. Die Torsionswinkel der jeweils restlichen beiden C_α-Substituenten wurden vereinfachend als $(\omega+120^\circ)$ und $(\omega-120^\circ)$ angenommen. Das Vorzeichen jedes Terms ergibt sich aus dem Vorzeichen des hinderen Oktanden, in dem sich die betreffende C_α→Substituent-Bindung befindet. Diese sind in die Ring-A-Projektion in Abb. 34 eingezeichnet.

Für den Ring A dürfte am ehesten die Konformation III zutreffen. Sie läßt sich wie die Konformation VI mit den ^{1}H-NMR- und CD-Daten vereinbaren, hat aber gegenüber letzterer den Vorteil, daß die sterische Hinderung zwischen $CH_3{}^{29}$ und $CH_3{}^{19}$ wesentlich geringer ist.

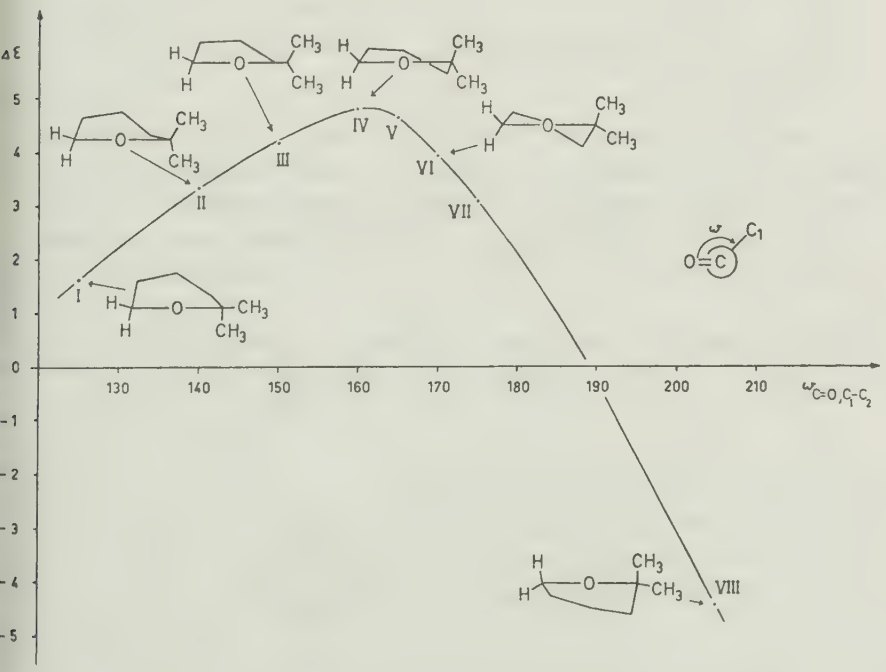


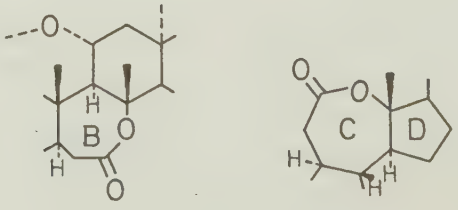
Abb. 35: Die nach Kirk[92] errechneten Δε - Werte für verschiedene Konformationen des Ringes A in Toonafolin (40).

c) Die Konformation des ε-Lacton-Ringes B:

Röntgenstrukturuntersuchungen an einigen gesättigten δ-Lactonen[88] sowie Messungen des Dipolmoments an ε-Lactonen[89] haben übereinstimmend gezeigt, daß die Lactongruppe (-C-CO-O-C planar ist. Nimmt man eine solche planare Lactongruppe auch für den ε-Lactonring B von Toonafolin als gegeben an, so ist dieser Ring in der Sesselkonformation fixiert, da die Konformation aller übrigen C-C-Bindungen (C^5, C^{10}, C^9, C^8) infolge der Ringverknüpfungen starr ist. Nach den Regeln von WOLF[88] und LEGRAND[90] ist das Vorzeichen des Cottoneffekts dem Vorzeichen des Torsionswinkels der (-C-C-CO-O-)-Gruppe entgegengesetzt. Bei Toonafolin läßt sich der Torsionswinkel $\omega_{(O-C^7-C^6-C^5)}$ zu +40° dem Dreidingmodell entnehmen. Dafür muß man einen negativen CE erwarten. Gefunden wurde $\Delta\varepsilon = -3$. Der Torsionswinkel ω erfordert für H^5 und $H^{6\beta}$ eine antiperiplanare und für H^5 und $H^{6\alpha}$ eine synclinale Anordnung, die durch die Kopplungskonstanten J = 11.3 und 2.3 Hz im ^{1}H-NMR bestätigt wurden.

Als weitere Bestätigung obiger Konformationsbestimmung dient der CD von Diacetoxy-3 ,24-oxa-12a-C-homocholanon-12 (42), der von LEGRAND und BUCOURT veröffentlicht wurde[90]. Der ε-Lactonring in (42) ($\Delta\varepsilon_{222nm}$ = +2.1) ist genau spiegelbildlich zu dem von Toonafolin (40) ($\Delta\varepsilon_{210\ nm}$ = -3.0) angeordnet.(Abb.36)

Abb. 36: Vergleich der ε-Lactonringe in (40) und (42)

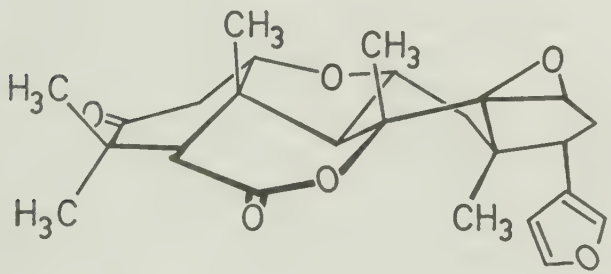


in (40) in (42)

.) Die räumliche Struktur von Toonafolin (40):

ufgrund der bisher beschriebenen spektrokopischen und
hemischen Daten kommt Toonafolin die in Abb. 37 dargestellte
äumliche Struktur zu:

bb. 37:



bb. 37 wurde nach einem Dreiding-Modell gezeichnet. Die viel-
ältigen räumlichen Interaktionen der Ringsubstituenten muß-
en dabei weitgehend unberücksichtigt bleiben.

II.) Die insektenfraßhemmende Wirkung der aus Toona ciliata isolierten Tetranortriterpenoide.

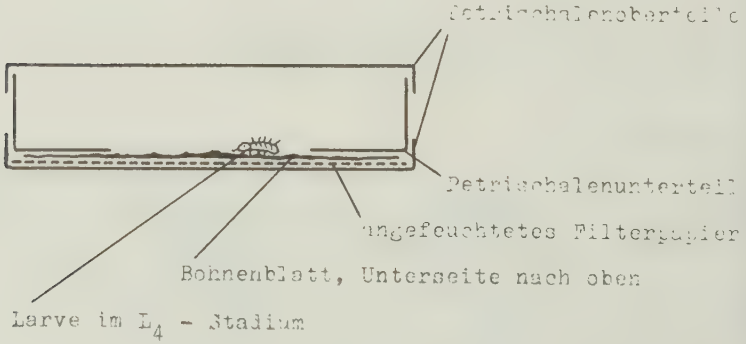
) Die Testmethode

s Versuchstier wurde der mexikanische Bohnenkäfer (Epilachna
rivestis Muls. (Coleoptera, Coccinellidae) gewählt, der vor
lem in Nord- und Mittelamerika starke Schäden an Bohnen der
ttung Phaseolus, Sojabohnen und Ladinoklee verursacht[91].
varivestis ist leicht zu züchten, da seine Larven sehr ro-
st sind. Darüberhinaus ist auch die Zucht der für die Tests
nutzten Wirtspflanze, der Buschbohne Phaseolus vulgaris,
rte "Saxa", das ganze Jahr über im Treibhaus einfach durch-

zuführen. Die Zucht von Epilachna varivestis wurde nach der von STEETS beschriebenen Methode durchgeführt[92].

Für die Tests selbst wurde die von STEETS[91] beschriebene Petrischalenmethode angewandt: Als "Versuchskäfige" dienten Kunststoffpetrischalen, die jeweils mit einer Larve im L_4-Stadium besetzt wurden (Abb. 38). Als Unterlage diente das Oberteil einer Petrischale, in das zuerst eine angefeuchtete Filterpapierscheibe, dann ein mit Testlösung behandeltes Bohnenblatt gelegt wurde und zwar mit der Blattunterseite nach oben. In dieses Petrischalenoberteil wurde ein Unterteil mit einem ausgestanzten Loch ($\varnothing$ = 4.2 cm) eingefügt und der so entstandene "Versuchskäfig" mit einem Oberteil verschlossen. Jedem Versuchstier stand somit die gleiche Blattfläche (ca. 14cm^2) zum Fraß zur Verfügung. Diese Methode hat gegenüber der in Japan entwickelten "Leaf disc"-Methode[93] den Vorteil, daß die Blätter unversehrt sind, durch längere Feuchtigkeitszufuhr länger frisch bleiben und somit die Freßlust der Larven nicht durch das Welken der Blätter beeinflußt wird.

Abb. 38:
Versuchsanordnung für den Petrischalentest

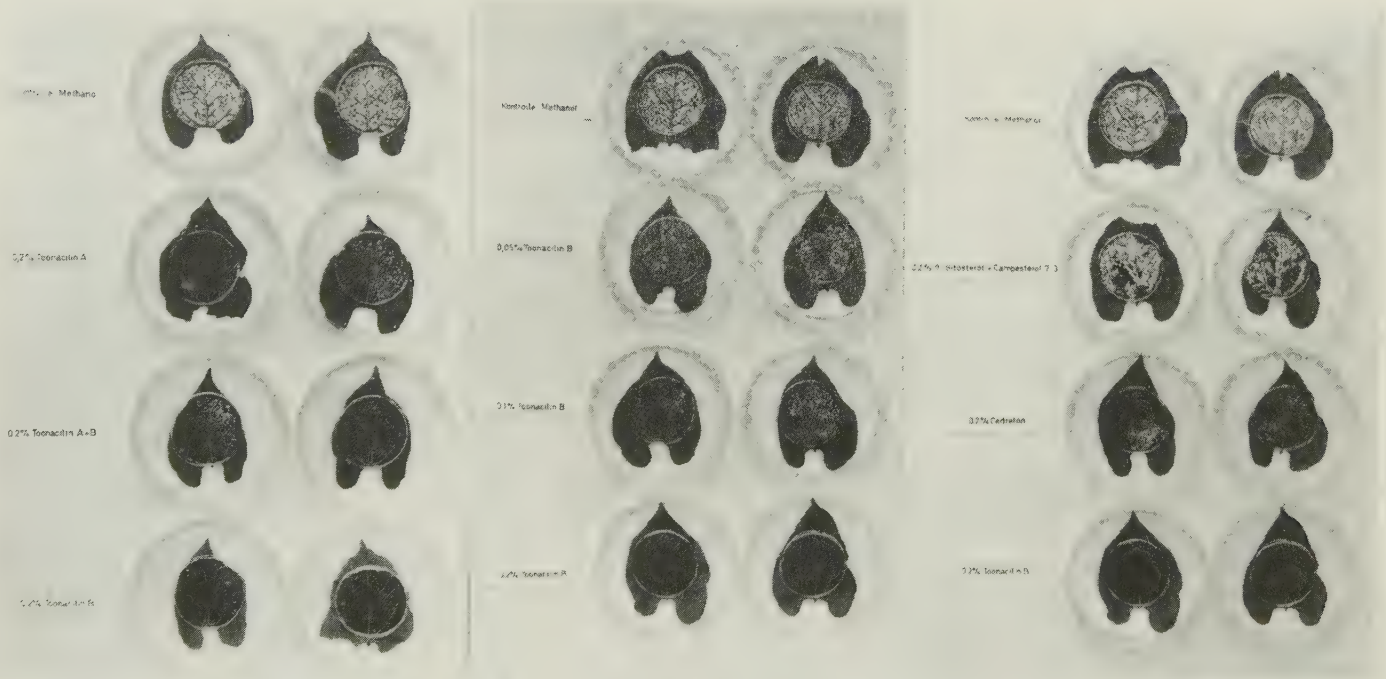


u jedem Test wurden 7 Blätter mit methanolischer Testlösung
nd als Blindprobe 3 Blätter mit Methanol behandelt. Dazu
urden die Blätter in die Testlösung getaucht und sofort an-
chließend mit einem kalten Föhn angeblasen um die Verdun-
tung des Lösungsmittels zu beschleunigen und so die Blatt-
berfläche möglichst wenig zu verändern. Versuche, die Test-
ösungen mit dem Pinsel oder durch Sprühen aufzutragen, führ-
en zu weniger gut reproduzierbaren Ergebnissen. Jeder Test
auerte 24 Std., davon 15 Std. unter künstlichem Tageslicht
nd 9 Std. bei Nacht. Im Raum herrschten konstant 25°C und
) % Luftfeuchtigkeit. Unter diesen Bedingungen wurden die
lattsegmente der Blindproben völlig gefressen. Jede Substanz
urde in verschiedenen Konzentrationen getestet. Als Kriterium
ür die Antifeeding-Aktivität diente die Konzentration der
estsubstanz, welche die Grenze zwischen völliger Fraßhemmung
nd beginnendem Fraß der Larven markierte. Diese wird im fol-
enden als Grenzkonzentration für völlige Fraßhemmung bezeich-
et. Zur qualitativen Beurteilung der neu gefundenen Substan-
en wurde Bergapten herangezogen, das einerseits als Inhalts-
toff der Samen von Toona ciliata bekannt[38] und andererseits
ls antifeedingaktiv gegen Larven im L_3-Stadium von Spodoptera
itura[94] erkannt worden ist. Weiter wurde als Blindprobe ein
nytosterolgemisch getestet.

.) Ergebnisse der Antifeeding-Tests:

ubstanz	Konz.+) %
oonacilin	0.15
-Acetoxytoonacilin	0.2
1-Hydroxytoonacilid	0.005
3-Hydroxytoonacilid	0.2
1-Acetoxytoonacilid	0.05
3-Acetoxytoonacilid	inaktiv
oonafolin	0.2
edrelon	0.2
ergapten	0.2
-Sitosterol/Campesterol 7:3	inaktiv

+) Grenzkonzentration für völlige Fraßhemmung



a) b) c)

Abb. 39: Antifeeding Test der Toonaciline. Die Bilder sind noch mit den alten Bezeichnungen Toonacilin A für 6-Acetoxytoonacilin und Toonacilin B für Toonacilin beschriftet.
a) Vergleich Toonacilin A und B
b) Verdünnungsreihe mit Toonacilin B
c) Vergleich von Toonacilin B mit Cedrelon und einem Steringemisch als Blindprobe

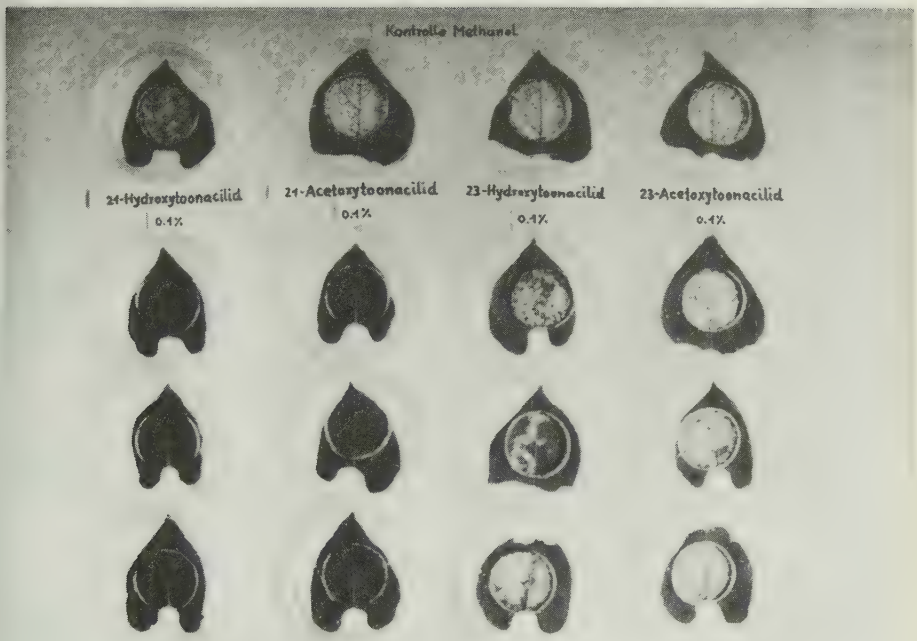


Abb. 40: Antifeeding- Test der Hydroxytoonacilide mit 0.1 proz. methanolischen Lösungen, die nach der Tauchmethode (vergl. S.101) aufgebracht wurden.

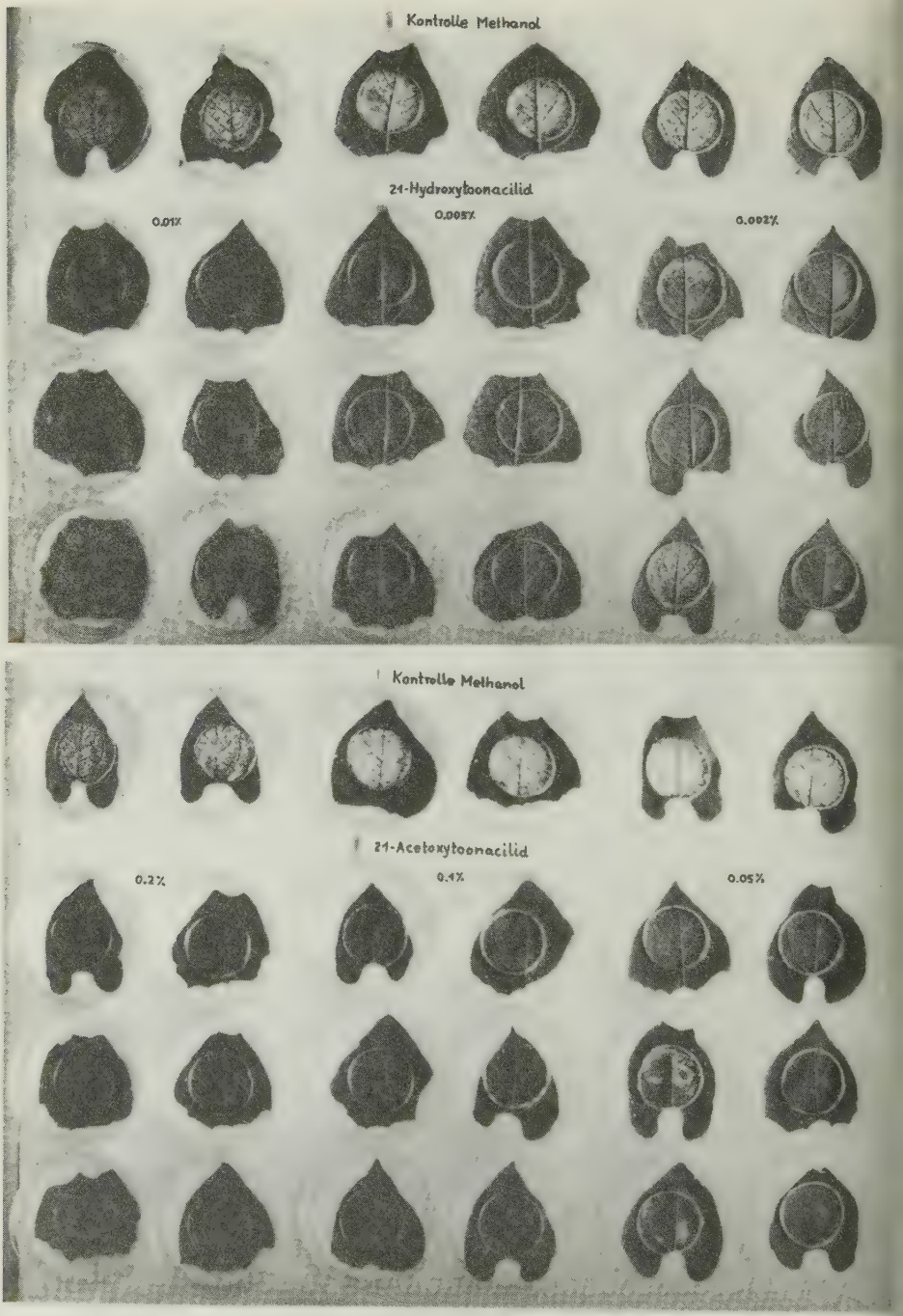


Abb. 41: Verdünnungsreihe mit 21-Hydroxy- und 21-Acetoxytoonacilid

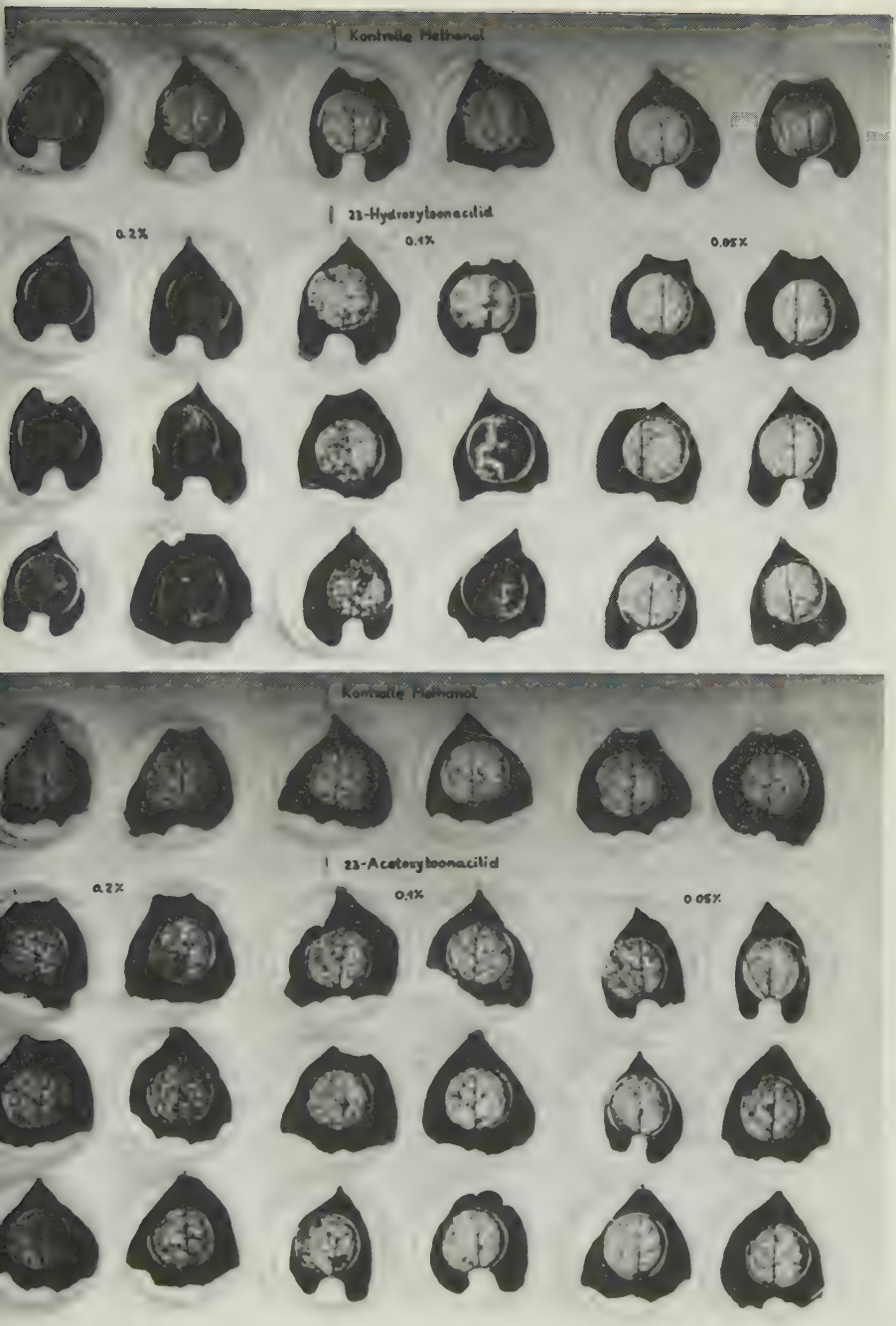


Abb. 42: Verdünnungsreihe mit 23-Hydroxy- und 23-Acetoxytoonacilid.

Abb. 43: Fraßtest an ganzen Bohnenpflanzen.
Dazu wurde eine der beiden Bohnenpflanzen mit dem Wurzelballen aus dem Topf genommen und mittels einer "Spray Gun", wie sie zum Entwickeln von Dünnschichtchromatogrammen benutzt wird, mit einer 0.005 proz. methanolischen Lösung von 21-Hydroxytoonacilid besprüht. Anschließend wurde sie wieder eingepflanzt und in einen Käfig mit 5 Epilachna varivestis -Larven im L_4-Stadium gebracht. Nach 24 Stunden war die unbehandelte Pflanze völlig kahl gefressen, während die behandelte nur unbedeutende Fraßstellen aufwieß. Dies zeigt auch, daß die Tiere beide Pflanzen aufsuchten, jedoch fast ausschließlich an der unbehandelten fraßen.

.) Beurteilung der Antifeeding-Tests

ie komplizierte Struktur und aufwendige Isolierung der bis-
er gefundenen, natürlichen Antifeedants versprechen kurz-
ristig keinen kommerziellen Einsatz im Pflanzenschutz. Die
orschung auf diesem Gebiet kann aber einen Einblick darüber
eben, welche Rolle chemische Substanzen in der Regulierung
atürlicher Lebensgemeinschaften spielen.

uch hat sich gezeigt, daß natürliche Antifeedants oft ein
anzes Spektrum sonstiger biologischer Aktivitäten aufweisen.
ls Beispiel seien hier nur Harrisonin (3)[17], Warburganal
nd Muzigadial[95] genannt, die neben der Antifeeding-Aktivi-
ät cytotoxische, antibakterielle, fungicide und das Pflan-
enwachstum beeinflußende Wirkungen zeigen. So kommt dem
ntifeeding-Test auch eine Indikatorfunktion zur Auffindung
ktiver Wirkstoffe im Pflanzenbereich zu, die nach ihrer Iso-
ierung und Strukturaufklärung immer ein breiteres biologisches
creening erfahren sollten.

n Holz und in der Rinde von Toona ciliata var. australis
ind nach den jetzt bekannten triterpenoiden Inhaltsstoffen
öchstens noch Nebenkomponenten in sehr geringer Konzen-
ration zu erwarten. Die Blätter jedoch scheinen noch interes-
ante Inhaltsstoffe, möglicherweise mit Antifeeding-Aktivität,
u versprechen. Rinde und Blätter von Toona ciliata, dort als
edrela toona Roxb. bezeichnet, sind auch von einer indischen
rbeitsgruppe auf biologische Wirkungen getestet worden[96].

abei zeigten Rindenextrakte muskelrelaxierende und krebs-
emmende Wirkungen, während bei den Blattextrakten anti-
rotozoische, blutzuckersenkende und muskelrelaxierende, so-
ie nicht näher genannte Wirkungen auf das Zentralnerven-
ystem beobachtet wurden.

VIII.) Zusammenfassung und biogenetische Einordnung der neu gefundenen Tetranortriterpenoide

Holz, Rinde und Blätter der Australischen "Zeder" Toona ciliata M.J. Roem. var. australis (Meliaceae) wurden auf triterpenoide Inhaltsstoffe untersucht mit dem Hauptaugenmerk auf insektenfraßhemmende Wirkstoffe, da Voruntersuchungen die Existenz solcher Wirkstoffe hatten vermuten lassen.

1.) Aus dem Holz wurden die üblichen Phytosterole ß-Sitosterol Campesterol und Stigmasterol als Mischkristalle isoliert. Ihre Zusammensetzung wurde gaschromatographisch ermittelt. Weiter wurden Cycloeucalenol (20) und 24-Methylencycloartanol (21) isoliert, die als biogenetische Vorstufen der Phytosterole angesehen werden. Die letzteren vier Sterole sind bisher für Toona ciliata nicht veröffentlicht worden. Für 24-Methylencycloartanol wurden zum ersten Mal die ^{13}C-NMR-Daten vollständig zugeordnet. Weiter wurden das bereits bekannte Tetranortriterpenoid Cedrelon (13) isoliert und Hinweise auf Spuren von dessen Derivaten Dihydrocedrelon und Desoxycedrelon massenspektrometrisch gefunden. Alle isolierten Substanzen wurden auf Antifeeding-Aktivität gegen den mexikanischen Bohnenkäfer Epilachna varivestis Muls. (Coleoptera, Coccinellidae) getestet und für inaktiv befunden.

2.) Aus der Rinde wurden neben den üblichen Phytosterolen (Cycloeucalenol, 24-Methylencycloartanol und Cedrelon wurden nicht gefunden) vier neue Tetranortriterpenoide isoliert und deren Strukturen mit chemischen und spektroskopischen Methoden aufgeklärt. Die neuen Substanzen, denen die Namen Toonacilin (26), 6-Acetoxy-toonacilin (27), 21-Hydroxy-toonacilid (29) und 23-Hydroxy-toonacilid (28) gegeben wurden, hatten alle fraßhemmende Wirkung auf Epilachna varivestis. Besonders hervorzuheben ist die hohe Antifeeding-Aktivität von 21-Hydroxy-toonacilid, das noch in einer Konzentration von 50 ppm voll wirksam ist.

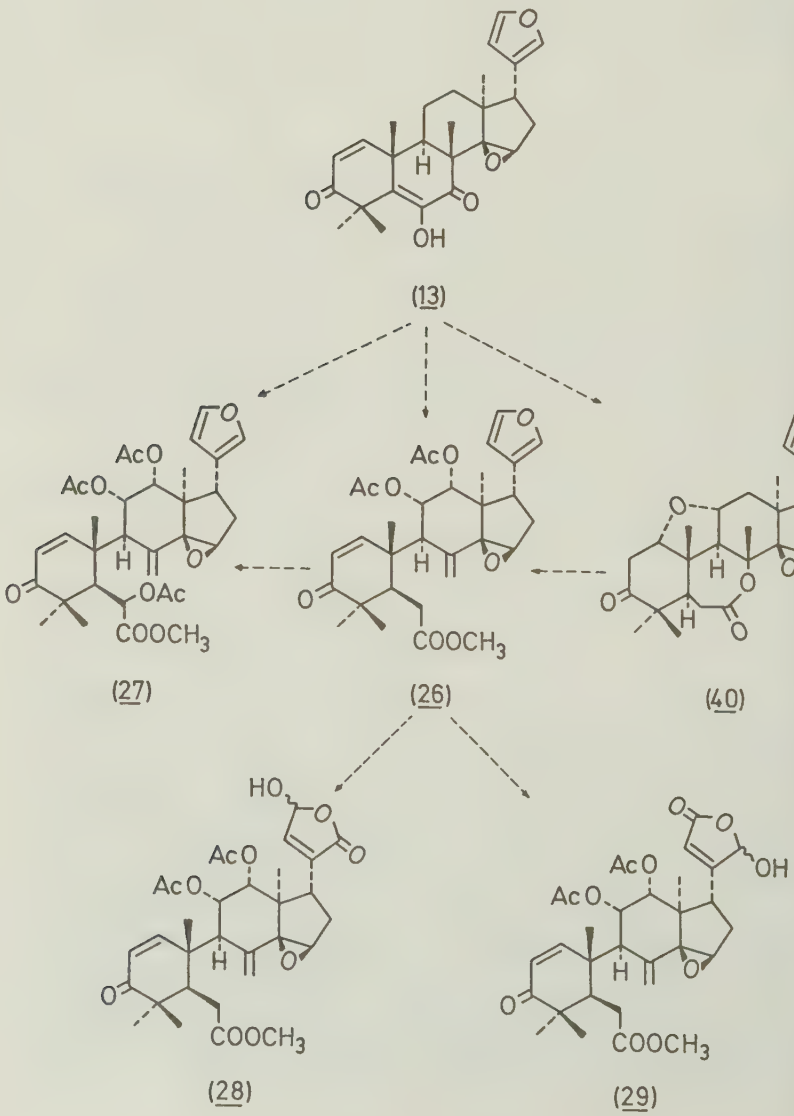
.) Bei Versuchen, die Toonacilide aus Toonacilin durch Photooxidation in aprotischen Lösungsmitteln herzustellen, wurde überwiegend 23-Hydroxytoonacilid neben Spuren von 21-Hydroxytoonacilid erhalten. Als Nebenprodukt wurde der neue Verbindungstyp der α-substituierten β,γ-Epoxybutanolide entdeckt. Beim Studium dieser Reaktion an 3-Methylfuran entstanden neben den erwarteten isomeren β,γ-Epoxybutanoliden (36) und (37) auch noch das wenig stabile 3-Methyl-2,3,4,5-diepoxytetrahydrofuran (38) und Citraconsäureanhydrid (39).

.) Aus den Blättern wurde ein neues Tetranortriterpenoid isoliert und dessen Struktur mit spektroskopischen und chemischen Methoden aufgeklärt. Diese Verbindung, die den Namen Toonafolin (40) erhielt, ist das erste natürlich vorkommende Tetranortriterpenoid aus den eng verwandten Familien der Meliaceae, Rutaceae und Simaroubaceae, bei dem die oxidative Öffnung des Ringes B auf der Stufe des ε-Lactons stehen geblieben ist. Bei Toonafolin wurde nur eine schwache fraßhemmende Wirkung festgestellt, obwohl sie aus der Fraktion isoliert worden war, die bei Vorversuchen die größte Antifeeding-Aktivität gezeigt hatte.

.) Allen fünf neu gefundenen Tetranortriterpenoiden ist die Ringverknüpfung des apo-Euphan-Skeletts gemeinsam. Die C^{17}-Seitenkette ist um 4 C-Atome zum Furanring (bei (26), (27), (40)) oder zum γ-Hydroxybutenolid (bei (28) und (29)) verkürzt. Im Gegensatz zu allen bisher bekannten weiteroxidierten Tetranortriterpenoiden aus Meliaceen, Rutaceen und Simaroubaceen ist bei den aus Toona ciliata isolierten Substanzen ausschließlich der Ring B bei sonst unverändertem Gerüst zunächst zum Lacton aufoxidiert worden. Während Toonafolin auf dieser Stufe stehenblieb, sind die Toonaciline und Toonacilide durch Hydrolyse, Veresterung und Dehydratisierung zu B-seco-Tetranortriterpenoiden weiter umgesetzt worden. Produkte dieser Reaktionsfolge, die sich vom Gedunintyp ableiten, sind wohlbekannt[16]. Auch Toonafolin ließ sich leicht auf diesem Wege zu den ent-

sprechenden Verbindungen umwandeln.

Die neuisolierten Tetranortriterpenoide sind im folgenden Schema in der Reihenfolge der vermuteten Biogenese aus Cedrelon (13) oder einem Vorläufer davon dargestellt:



EXPERIMENTELLER TEIL

. Verwendete Geräte:

ür Infrarotspektren: IR-Spektralphometer IMR 25 der Fa. Zeiss.

ür Ultraviolettspektren: Spektralphometer DMR 10 der Fa. Zeiss.

ür Kernresonanzspektren:
) MHz-^{1}H-NMR: EM 360 Spektrometer der Fa. Varian.
) MHz-^{1}H- und 23 MHz-^{13}C-NMR: HX-90-R-Spektrometer der Fa. Bruker.
50 MHz-^{1}H-NMR: WH-360-Spektrometer[55] der Fa. Bruker.

ür Massenspektren: MAT 311 A Spektrometer der Fa. Varian.

ür Circulardichrogramme: [53] Circulardichrograph Mark III er Fa. Jobain-Yvon.

ür Drehwerte: Polarimeter 241 der Fa. Perkin-Elmer.

ür Schmelzpunkte: Schmelzpunktsbestimmungsapparat SMP 20 ach Dr. Tottoli der Fa. Büchi. Die Schmelzpunkte sind nicht orrigiert.

ie Mikroanalysen wurden bei Herrn Dr. Roczinski von der Uni- ersität Stuttgart durchgeführt.

ür Kugelrohrdestillation: Modell GKR 50 der Fa. Büchi.

ür die Gaschromatographie: Modell Fractovap 2101 der Fa. Car-) Erba mit 2 m x 4 mm-Glassäulen, Flammenionisationsdetektor, rägergas: Stickstoff, Füllung: a) 3 % SE 30 auf Chromosorb. W
b) 3 % OV 17 auf Gaschrom. Q

ür die Hochdruckflüssigchromatographie wurden selbst zusam- ngestellte Geräte verwendet[97] mit folgenden Bauteilen:

r analytische Zwecke:
mpe: Dreikopfmembrankolbenpumpe M384 der Fa. Orlita, Lahn- eßen.

Druckregelung und Pulsationsdämpfung: Bauteil nach DEININGER und HALASZ[98].
Probenaufgabe: Probenaufgabeschleife Modell U6K der Fa. Waters
Detektor: UV-Detektor Spektroflow Mod. 770 der Fa. Schoeffel.
Säulen: Stahlsäule 250 x 4 mm, selbstgepackt nach der "Balanced Density"-Methode.
Packung: Die zu füllende Säule wird unten mit einem Abschlußstück verschraubt, in das ein Stahlgewebe und eine Scheibe dickes Filterpapier zur Stütze des Packungsmaterials eingelassen ist. Sie wird oben an einen etwa 100 ml fassenden Packungstopf angeschraubt, der mit der Pumpe verbunden ist. Zur Bereitung einer Suspension werden 2.4 g LiChrosorb Si 100 10μ (E. Merck) nach und nach mit 33 ml Tetrachlorkohlenstoff/Dioxan 1:1 angeschlämmt und 5 Min. im Ultraschallbad homogenisiert. Dann werden 21 ml Tetrabromaethan eingerührt. Die Suspension nochmals 7 Min. im Ultraschallbad homogenisiert, dann sofort in den Packungstopf gegeben und vorsichtig mit Pentan überschichtet. Der nun randvolle Packungstopf wird verschlossen und die Suspension mit Pentan bei voller Pumpenleistung in die Säule gedrückt, wobei der Druck vorübergehend auf 330 bis 350 atm ansteigt.

Die Packung mit LiChrosorb RP-8 oder RP-18, 10μ (E. Merck) geht analog, jedoch werden zum Anschlämmen statt 33 jetzt 35 ml Tetrachlorkohlenstoff/Dioxan 1:1 verwendet.

Für praeparative Zwecke:
Pumpe: Membrankolbenpumpe FLMK 50/1 der Fa. Lewa, Leonberg
Pulsationsdämpfung: Pulsationsdämpfer Modell MPD 5 der Fa. Lewa
Probenaufgabe: Sample Injection Valve R 60 SV der Fa. Latek, Heidelberg
Detektor: UV-Detektor Spectrochrom M der Fa. Abimed
Säulen: Glassäulen 250 x 25 mm, Säulenabschluß an beiden Enden mit durchbohrten Teflonstopfen mit eingelassener D3-Fritte nach GLATZ[99].
Packung: Die zu packende Säule wird unten mit einem Abschlußstopfen versehen und oben durch einen Verbindungsstopfen (6mm Bohrung) mit einer Packungssäule mit 200 ml Inhalt verbunden. Zur Bereitung einer Suspension werden 60 g Li-Chroprep. Si 60,

15-25 µ (E. Merck) mit 120 ml Tetrachlorkohlenstoff/Aceton 1:1 angeschlämmt und 1 Minute im Ultraschallbad homogenisiert. Die Suspension wird unverzüglich durch einen Trichter in die zu packende Säule gefüllt. Das Rohr des Trichters muß dabei durch die Vorsäule und den Verbindungsstopfen bis zum Grund der zu packenden Säule geführt werden. Er wird in dem Maß hochgezogen, wie die Suspension einläuft. Nun wird vorsichtig mit Aceton überschichtet, bis die Vorsäule voll ist. Diese wird verschlossen und an die Pumpe angeschlossen. Die Suspension wird nun bei voller Pumpenleistung eingedrückt, wobei der Druck vorübergehend bis auf 200 PSI (13.6 atm) ansteigt.

Die Packung mit LiChroprep RP-8 25-40 µ (E. Merck) geht analog, jedoch wird zum Anschlämmen und Eindrücken ausschließlich Methanol/Wasser 3:1 verwendet.

Säulenchromatographie:
Zur Füllung offener Chromatographiesäulen wurde ausschließlich Kieselgel 60, 0.063 - 0.2 mm der Fa. E. Merck verwendet. Alle als Fließmittel eingesetzten Lösungsmittel wurden vor Gebrauch über Molekularsieb (E. Merck) oder neutrales Aluminiumoxyd Woelm N-Super I getrocknet und über Füllkörperkolonne destilliert.

Dünnschicht-Chromatographie:
Es wurden ausschließlich "DC-Alufolien Kieselgel 60 F_{254}" der Fa. E. Merck verwendet.

Photooxidation:
Eine wassergekühlte Quecksilber-Hochdruck-UV-Lampe Hanau TQ 150 W wurde in Pyrex-Apparaturen eingesetzt.

II. Herkunft des Pflanzenmaterials:

Holz, Rinde und Blätter von Toona ciliata var. australis stammen von einer Versuchsstation des Forestry Departments of Queensland, Brisbane, Australien. Standort: Reserve 191 Barron, 17° 17' südl. Breite und 145° 30' östl. Länge, Höhe 800 m, mtl. jährl. Regenmenge 2490 mm. Die Blätter wurden vor dem Versand luftgetrocknet.

III. Isolierung von triterpenoiden Inhaltsstoffen des Holzes von Toona ciliata var. australis:

1.) Extraktion

Das entrindete Holz wird gehobelt und die Hobelspäne in einer Brabender Heumühle gemahlen. Das Holzmehl wird 36 Std. nach dem Soxhlet-Verfahren mit Petrolaether 30-50° extrahiert. Aus 3.7 kg gemahlenem Holz scheidet sich beim Einengen der ca. 15 l Petrolaether-Lösung auf ca. 1 l Cedrelon (13) als weißes Pulver ab. Dieses wird abgetrennt und aus Aceton/Aether umkristallisiert. Ausbeute: 16.5 g (0.45 %) reines Cedrelon, Schmp. 206-208° (Lit.:[26c] 209-214°C), α_D^{20}: -64°, $CHCl_3$, c=1 (Lit.[26c]: α_D: -64.5°, $CHCl_3$, c=1); IR und UV[26c], MS[38] sowie ^1H- und ^{13}C-NMR-Daten[25] waren identisch mit den Literaturdaten. Nach dem Eindampfen der Mutterlauge verbleiben 42.5 g Substanz.

Das Holzmehl wird anschließend 36 Std. mit Aether nach dem Soxhletverfahren extrahiert. Beim Einengen der Lösung auf ca. 1 l scheidet sich ein Sterol-glykosid-Gemisch als weißes Pulver ab. Dieses wird abgetrennt und aus Essigester umkristallisiert. Ausbeute: 6 g Sterolglykosidgemisch. Die Mutterlauge enthält nach DC und MS hauptsächlich Sterole und deren Glykoside.

.) Trennung der Cedrelon-Mutterlauge

ortrennung:

äule 1: Offene Säule mit 800 g Kieselgel
ließmittel: Benzol/Essigester (9:1)
rgebnis: 22.5 g Fette u. Wachse; verworfen
5.5 g Frakt. A, enthält Cedrelon, Dihydrocedrelon und Desoxycedrelon, sehr stark durch Lipide verunreinigt.
9.1 g Frakt. B, enthält Cycloeucalenol, 24-Methylen-cycloartanol und weitere Phytosterole.
2.0 g Frakt. C, enthält vorwiegend ß-Sitosterol, Stigmasterol und Campesterol.

ntersuchung der Frakt. A:

äule 2: HPLC-Säule 250 x 25 mm, gef. m. 60 g LiChroprep I 60, 15-25 μ (E. Merck, Darmstadt) N_{th} = 600 Böden
ufgabe: Pro Spritze ca. 500 mg gelöst in 0.5 ml Fließmittel
ließmittel: Methylenchlorid mit 1 % Aceton
urchfluß: 13.5 ml/Min.
etektion: UV, 280 nm
rgebnis: Neben Fraktionen, die Cedrelon und 24-Methylencycloartanol enthalten, werden aus 5.5 g der Frakt. A 20 mg eines Gemisches isoliert, das nach MS-Vergleich etwa zu gleichen Teilen aus Desoxycedrelon[36] und Dihydrocedrelon[38] besteht.

rennung der Frakt B:

äule 3: Offene Säule mit 200 g Kieselgel
ließmittel: Methylenchlorid/Aceton (95:5)
rgebnis: Nach Abtrennung der Wachsanteile verbleiben 1.6 g (0.043 %) Cycloeucalenol (20), Schmp. 138°C (aus Aceton) (Lit:[100] 138-139°C), IR, MS und ^{1}H-NMR[39], sowie ^{13}C-NMR[40] waren identisch mit den Literaturdaten.

.7 g Mutterlaugenware von Cycloeucalenol werden chromatographisch weiteraufgetrennt:
äule 4: Offene Säule mit 120 g Kieselgel

Fließmittel: Methylenchlorid/Essigester (95:5)
Ergebnis: Neben Cycloeucalenol und ß-Sitosterol werden 300 mg (0.008 %) 24-Methylencycloartanol (21) gewonnen, Schmp. 122°C aus Methanol (Lit:[25] 121-122.5°C); MS[41], IR und ^{1}H-NMR[25] waren identisch mit den Literaturdaten; ^{13}C-NMR-Daten siehe Tab. 2, der Mischschmelzpunkt mit einer authentischen Probe[42] zeigte keine Depression.

Untersuchung der Frakt. C:

Die Phytosterole aus Frakt. C werden chromatographisch gereinigt:
Säule 5: Offene Säule mit 80 g Kieselgel
Fließmittel: Methylenchlorid/Aceton (9:1)
Ergebnis: 1.6 g (0.043 %) Mischkristalle, Schmp. 137-138°C (aus Aceton) aus 72 % ß-Sitosterol, 2 % Stigmasterol und 26 % Campesterol. Eine dünnschichtchromatographische Trennung der 3 Phytosterole war nicht möglich. Das Mischungsverhältnis wurde gaschromatographisch ermittelt (2m-Glassäule, gefüllt mit 3 % SE-30 auf ChromosorbW, Temp. 270°C, Trägergas 1.4 atm. N_2). Die Identifizierung erfolgte zunächst durch FD-MS, das die Molmassen m/e = 414, 412 und 400 lieferte, dann durch Vergleich des ^{1}H-NMR-Spektrums der Mischkristalle mit einem Testgemisch in obigem gaschromatographisch ermitteltem Verhältnis aus authentischen Proben. Diese wurden von der Fa. Applied Science Laboratories, Penna, USA bezogen.

DC-Daten der gefundenen Triterpenoide:

Günstigstes Fließmittel: Methylenchlorid/Aceton (95:5)
R_f-Werte: 0.68 Cedrelon
0.62 Dihydrocedrelon
0.58 Desoxycedrelon
0.51 24-Methylencycloartanol
0.47 Cycloeucalenol
0.38 ß-Sitosterol, Stigmasterol, Campesterol

3.) Hydrolyse der Sterolglykoside

330 mg Sterolglykoside werden in 30 ml Aethanol 96 % gelöst und nach Zugabe von 0.6 ml konz. HCl 5 Std. unter Rückfluß gekocht. Die Lösung wird auf ca. 3 ml eingeengt, mit H_2O versetzt und mit Aether extrahiert. Nach Waschen mit gesättigter $NaHCO_3$-Lösung und gesättigter NaCl-Losung, Trocknen über Na_2SO_4 und Eindampfen verbleiben 260 mg Aglykongemisch. DC und MS zeigen, daß dieses aus 24-Methylencycloartanol, Cycloeucalenol, ß-Sitosterol, Stigmasterol und Campesterol besteht.

IV. Isolierung von triterpenoiden Inhaltsstoffen aus der Rinde von Toona ciliata var. australis.

1.) Extraktion:

Die Rinde wird weitgehend von Flechten und Moosen befreit, mit einer Bandsäge in 1 bis 2 cm starke Streifen gesägt und diese in einer Brabender-Heumühle staubfein gemahlen. Das Pulver wird 36 Std. nach dem Soxhlet-Verfahren mit Petrolaether 30-50° extrahiert. Aus 20.8 kg pulverisierter Rinde scheiden sich beim Einengen der etwa 15 l Petrolaetherlösung auf 1l 8.2g einer dickflüssigen, braunen Masse aus, die sich nur noch in Aether löst. Die überstehende Lösung wird dekantiert und eingedampft. Es verbleiben 49.5 g Petrolaetherextrakt, der neben viel fetten Ölen, Wachsen und Phytosterolen geringe Mengen Toonaciline und Hydroxytoonacilide enthält.

Die zuvor ausgeschiedene Substanz von 8.2 g wird in Aether gelöst und dann auf 20 ml eingeengt. Durch Stehenlassen über Nacht scheidet sich etwa 1 g rohes Atranorin (24) ab, das aus Aceton umkristallisiert wird. Ausbeute 850 mg reiner Kristalle vom Schmp. 195-196°C (Lit. 194-196°C); IR[101], MS[102] und ^{1}H-NMR[103] sind identisch mit den in der Literatur gefundenen Daten.

Das bereits mit Petrolaether extrahierte Rindenpulver wird nun 36 Std. mit Aether extrahiert. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels verbleiben 111 g Aether-Extrakt, der mit der Mutterlaugenware von Atranorin (7.3 g) vereinigt wird.

2.) Trennung der Extrakte:

Chromatographie des Petrolaetherextrakts (49.5 g):

Säule 1: Offene Säule mit 1.5 kg Kieselgel
Fließmittel: Benzol/Essigester (85:15 und 65:35), Aceton
Ergebnis: Mit Bz/EE 85:15 werden Öle, Wachse und Phytosterole eluiert
" " " 65:35 werden vorwiegend Toonaciline eluiert (Toonacilin Fraktion 7.4 g)
" Aceton werden vorwiegend Hydroxytoonacilide eluiert (Hydroxytoonacilid Frakt. 6.7 g)

Chromatographie des Aetherextrakts (118 g):

Säule 2: Offene Säule mit 2.2 kg Kieselgel
Fließmittel: Methylenchlorid/Aceton (8:2)
Ergebnis: 3.0 g unpolare Verunreinigungen
62.2 g Toonacilin-Fraktion
28.6 g Hydroxytoonacilid-Fraktion
14.8 g polare Verunreinigungen, eluiert mit Aceton

Chromatographie der vereinigten Toonacilin-Fraktionen aus Petrolaether- und Aether-Extrakt (69.6 g):

Säule 3: Offene Säule mit 1.6 kg Kieselgel
Fließmittel: Benzol/Essigester (8:2 u. 75:25), Essigester
Ergebnis: Mit Bz/EE 8:2 : 12.3 g Fette und Wachse
12.5 g Phytosterole, krist. aus Aceton, Schmp. 134-135°C, identifiziert durch DC und MS als Mischkristalle von ß-Sitosterol, Stigmasterol und Campesterol

Mit Bz/EE 75:25 : 25.6 g Toonaciline angereichert und Zeorin
Mit EE : 15.6 g Hydroxytoonacilide

Abtrennung von Zeorin: Die mit Toonacilinen angereicherte Fraktion wird in ca. 100 ml Aether gelöst. Dabei scheidet sich Zeorin (25) als weißes Pulver ab, das abgetrennt und aus Aceton umkristallisiert wird. Die Kristalle werden mit Aether gewaschen.
Ausbeute: 670 mg, Schmp. 244-6°C (Lit.[104]: 228-229°C); R_f-Wert, IR-, MS- und ^{1}H-NMR-Spektrum waren mit denen einer authentischen Probe von Zeorin[46] identisch. Deren Schmelzpunkt war 242-4°C.

Chromatographische Abtrennung der Phytosterole aus der mit Toonacilinen angereicherten Fraktion (22.5 g).

Säule 4: Offene Säule mit 750 g SiO_2
Fließmittel: Methylenchlorid/Aceton (8:2), dadurch Umkehrung der R_f-Werte von Phytosterolen und Toonacilinen gegenüber der Säule 3.
Ergebnis: 12.1 g rohes Toonacilin, frei von Phytosterolen, aber noch mit Wachsen verunreinigt.

Reinigung und Trennung der Toonaciline (12.1 g).

Die Substanz wird in Methanol gelöst und bei 45°C Badtemperatur am Rotationsverdampfer auf etwa 10 ml eingeengt. Beim Abkühlen flocken allmählich die Wachse aus. Diese werden abzentrifugiert. Die überstehende klare Lösung wird mit Methanol auf ca 25 ml verdünnt und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Zunächst scheiden sich 780 mg Prismen vom Schmp. 151-152°C aus (1:1-Mischkristalle aus Toonacilin und 6-Acetoxytoonacilin, vergl. HPLC, Abb. 1), die abgetrennt werden. Die Mutterlauge wird auf ca. 10 ml eingeengt. Aus dieser Lösung scheiden sich 480 mg reines Toonacilin (26) in Nadeln aus. Schmp.: 118-119°C; $[\alpha]_D^{20}$: +69° ($CHCl_3$, c=1), $C_{31}H_{38}O_9$, ber. C 67.13 %, H 6.91 % gef. 66.50 % C, 6.86 % H.
Spektren: IR: Abb. 4 , Interpretation S. 44 , MS: Abb. 12 ,

Interpretation S.45, ^{1}H-NMR: Abb. 7 , Interpretation Tab. 4 , ^{13}C-NMR: Abb. 3 , Interpretation Tab. 6 . CD: Abb. 6 , Interpretation S.27 .

Die ganze Reinigungsprozedur (Chromatographie, Fällung der Wachse, fraktionierte Kristallisation) wird mit der Mutterlauge noch zweimal wiederholt. Dabei fällt alles 6-Acetoxytoonacilin in Form von 1:1-Mischkristallen mit Toonacilin an.

Trennung der Mischkristalle:

Säule 5: HPLC-Säule 250 x 25 mm, gef. m. 60 g LiChroprep. Si 60, 15-25 μ (E. Merck, Darmstadt) N_{th} 600 Böden
Aufgabe: Pro Spritze ca. 250 mg Subst. gelöst in 0.5 ml Fließmittel
Fließmittel: Methylenchlorid/Essigester(9:1)
Durchfluß: 13 ml/Min
Detektion: UV, 263 nm
Die beiden Komponenten werden jeweils aus Methanol kristallisiert. Die Mischfraktionen und Mutterlaugen werden aufs Neue gespritzt. Gesamtausbeute einschließlich der oben beschriebenen fraktionierten Kristallisation: 7.32 g Toonacilin
0.35 g 6-Acetoxytoonacilin
0.43 g 1:1-Mischkristalle

Daten von 6-Acetoxytoonacilin (27): Prismen, Schmp. 215°C, α_D^{20} = +42.5° ($CHCl_3$, c=1), $C_{33}H_{40}O_{11}$, ber. C 64.69 %, H 6.57 % gef. C 64.69 %, H 6.58 %. Spektren: IR: Abb. 4 , Daten S. 44, MS: Abb.12 , Daten S. 47, ^{1}H-NMR Abb. 2 , Interpret. Tab. 4 , ^{13}C-NMR: Abb. 13, Interpret. Tab. 6 , CD: Abb. 6 , Interpret. S. 27.

Chromatographie der vereinigten Hydroxytoonacilid-Fraktionen (50.9 g):

Säule 6: Offene Säule mit 750 g Kieselgel
Fließmittel: Essigester/Petroaether 30-50° (8:2)
Die 50.9 g Substanz werden in Portionen zu je 12 bis 13 g auf insgesamt 5 solcher 750 g - Säulen getrennt, wobei die Misch-

fraktionen aus 23- und 21-Hydroxytoonacilid jeweils der nächsten Säule zugeschlagen werden.
Ergebnis: 15.3 g 23-Hydroxytoonacilid, roh
u. 6.8 g 21-Hydroxytoonacilid, roh
Die abgetrennten Lipidfraktionen werden verworfen.

Reinigung von 23-Hydroxytoonacilid:

Das rohe 23-Hydroxytoonacilid ist noch mit geringen Mengen von Lipiden ähnlicher Polarität verunreinigt. Diese werden durch "Reversed-Phase"-Chromatographie abgetrennt. Z.B. wurden 920 mg Rohsubstanz aufgetrennt auf:
Säule 7: HPLC-Säule 250 x 25 mm, gef. m. 60 g LiChroprep RP-8, 25-40 μ (E. Merck, Darmstadt) N_{th} 2720 Böden
Aufgabe: Pro Spritze ca. 230 mg Subst., gelöst in 0.5 ml Methanol
Fließmittel: Methanol/Wasser (3:1)
Durchfluß: 6.5 ml/Min.
Detektion: UV, 280 nm
Ergebnis: 800 mg reines 23-Hydroxytoonacilid (28), Schmp:154-155°C (aus Methanol), C^{23}-Epimerengemisch, $C_{31}H_{38}O_{11}$, Hochaufgel. MS: m/e ber. 586.24141, gef. 586.24078. IR (KBr , cm^{-1}): 3430, ν_H, OH; 3080, ν_H $=CH_2$; 3040, ν_H, $=C\langle^{H}_{R}$; 1747, ν_{CO}, Ester u. Lacton; 1679, ν_{CO}, Cyclohexenon; 932, δ_{oop} (C-H), $=CH_2$; 842, ν_{as} (C-O-C), Epoxid.
MS m/e: 586 (26 %, M^+), 568 (5.4 % $M^+ - H_2O$), 526 (8.9 %, $M^+ - CH_3COOH$), 466 (11.6 %, $M^+ - 2 \times CH_3COOH$), 449 (10.8 %), 448 (9.7 %, $M^+ - 2 \times CH_3COOH - H_2O$), 433 (14.3 %, vergl. Abb.17), 391 (42 %, vergl. Abb. 17), 375 (15.7 %), 373 (11.4 % = 433 - 60), 313 (24 % = 433 - 120), 311 (34.5 %), 297 (73 % = 433 -120 -15 -1), 209 (100 %, Ring A-Fragment), 177 (37 % Ring-A-Fragment-CH_3OH), 137 (74 %, Ring-A-Fragment $-C^5$-Seitenkette), 121 (78 %) 107 (53 %), 105 (75 %), 93 (41 %), 91 (46.5 %).
^{1}H-NMR: Abb. 16, Interpret. Tab.: 7.
^{13}C-NMR: Zugeordnete Daten Tab. 9.

Reinigung von 21-Hydroxytoonacilid

Noch anhaftende Lipide werden durch "Reversed-Phase"-Chromatographie abgetrennt. Z.B. werden 195 mg Rohsubstanz aufgetrennt auf Säule 8: identisch mit Säule 7
Aufgabe: Eine Spritze mit 195 mg Substanz gelöst in 0.5 ml Methanol
Fließmittel: Methanol/Wasser (3:1)
Durchfluß: 8 ml/Min.
Detektion: UV, 217 nm
Ergebnis: 180 mg reines 21-Hydroxytoonacilid (31), harter, weißer Schaum, konnte nicht kristallisiert werden, C^{21}-Epimerengemisch, $C_{31}H_{38}O_{11}$, Hochaufgel. MS: m/e ber. 586.24141, gef. 586.23264.
IR: (KBr, cm^{-1}) 3420, ν_H, OH; 3085, ν_H, $=CH_2$; 3030, ν_H, $=C\langle^{H}_{R}$; 1747, ν_{CO}, Ester und Lacton; 1678, ν_{CO}, Cyclohexenon; 928, δ_{oop} (C-H), $=CH_2$; 838, ν_{as} (C-O-C) Epoxid.
MS: m/e = 586 (30 %), 526 (9.5 %), 508 (3 %), 403 (7.3 %), 391 (10.3 %), 375 (7.1 %), 360 (13.3 %), 320 (19 %), 318 (29.7 %), 311 (10.6 %), 302 (25.5 %), 297 (15.8 %), 258 (10.6 %), 209 (100 %), 208 (64 %), 177 (36 %), 137 (56 %), 135 (44 %), 121 (55 %), 107 (39 %), 105 (55 %), 91 (38 %).
^{1}H-NMR: Tabelle 7.

Angaben zur Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelfolien (R_f-Werte):

Allgemeine Trennung: Methylenchlorid/Aceton (8:2)

Toonacilin + 6-Acetoxytoonacilin	0.63
ß-Sitosterol + Stigmasterol + Campesterol	0.50
21-Hydroxytoonacilid	0.27
23-Hydroxytoonacilid	0.18

Umkehrung der R_f-Werte zur Abtrennung der Phytosterole: Benzol/Essigester (8:2)

ß-Sitosterol + Stigmasterol + Campesterol	0.29
Toonacilin + 6-Acetoxytoonacilin	0.18
23- und 21-Hydroxytoonacilid	0.00

Trennung der Toonaciline: Methylenchlorid/Essigester (9:1), 2 x Entwickeln

6-Acetoxytoonacilin	0.31
Toonacilin	0.25

Trennung der Hydroxytoonacilide: Essigester/Petrolaether 30-50° (8:2)

21-Hydroxytoonacilid	0.37
23-Hydroxytoonacilid	0.21

3.) Acetylierung der Hydroxybutenolide.

23-Acetoxytoonacilid (30): 550 mg reines 23-Hydroxytoonacilid (28)werden in 4 ml abs. Pyridin gelöst, im Eisbad gekühlt und unter Umschütteln mit 4 ml Acetanhydrid versetzt. Das Gemisch wird 2.5 Std. bei Raumtemperatur stehen gelassen, dann bei 45°C Badtemperatur am Rotationsverdampfer vollständig eingedampft und schließlich noch zweimal in Toluol gelöst und wieder eingedampft. Der Rückstand wird in Methanol gelöst und auf ca. 2 ml eingeengt, dabei kristallisieren 150 mg des Hauptepimeren (30a)aus (Schmp. 188-189°C, α_D^{20}: +47°, $CHCl_3$, c = 1). Die Mutterlauge wird unter den Bedingungen von Säule7 chromatographiert, wobei nochmals 400 mg des Hauptepimeren und 40 mg einer Fraktion, die das Nebenepimere stark verunreinigt enthält. Aus dieser Fraktion werden durch praeparative Dünnschichtchromatographie an Merck-SiO_2-Aluminiumfertigfolien mit Essigester/Petrolaether 30-50° (7:3) 2 mg des Nebenepimeren (30b)gewonnen (R_f-Werte: (28): 0.18, (30a): 0.34, (30b): 0.39.

Spektren von (30a):

IR: (KBr, cm^{-1}): 3095, ν_H, $=CH_2$; 3030, ν_H, $=C\langle^H_R$; 1776, ν_{CO}, Lacton; 1747, ν_{CO}, Ester; 1683, ν_{CO}, Cyclohexenon; 932, δ_{oop} (C-H), $=CH_2$; 841, ν_{as} (C-O-C), Epoxid.

MS: m/e = 628 (2.1 %, M^+), 586 (1.8 %, $M^+ - CH_3COOH$), 491 (1.6 %), 448 (2.6 %, M^+ - 3x CH_3COOH), 433 (4.2 %, vergl. Abb. 17), 420 (3.4 %), 419 (2.6 %, M^+ -Ring-A-Fragment), 375 (3.9 %), 373 (2.9 % = 433 -60), 313 (4.9 % = 433 -120),

311 (8.3 %), 297 (12 % = 433 -120 -15 -1), 258 (22 %), 209 (100 %, Ring-A-Fragment $-CH_3OH$), 137 (38 %, Ring-A-Fragment $-C^5$-Seitenkette), 121 (50.5 %), 107 (32.5 %), 105 (27 %), 93 (23 %), 91 (26 %).

^{1}H-NMR: Abb. 16, Interpretation Tab. 8.

^{13}C-NMR: Zugeordnete Daten Tab. 9.

21-Acetoxytoonacilid (32): 1.72 g rohes 21-Hydroxytoonacilid (2 (aus Säule 6) werden in 12 ml abs. Pyridin gelöst, im Eisbad gekühlt und unter Umschütteln mit 12 ml Acetanhydrid versetzt. Das Gemisch wird 2.5 Std. bei Raumtemperatur stehen gelassen, dann bei 45°C Badtemperatur am Rotationsverdampfer vollständig eingedampft und schließlich noch zweimal in Toluol gelöst und wieder eingedampft. Der Rückstand wird über 180 g Kieselgel mit Methylenchlorid/Essigester (85:15) chromatographiert. Dabei werden nach 110 mg einer noch unreinen Vorfraktion 920 mg reines (32) erhalten, das nach dem ^{1}H-NMR-Spektrum als Epimerengemisch vorliegt, welches weder getrennt noch kristallisiert werden kann. Es fällt als harter Schaum an. Spektren:

IR (CCl_4, cm^{-1}): 3082, ν_H, $=CH_2$; 3030, $=C\langle^H_R$; 1808, ν_{CO}, Lacto 1758, ν_{CO}, Ester; 1688, ν_{CO}, Cyclohexenon; 932, δ_{oop} (C-H), $=CH_2$; 838, ν_{as} (C-O-C), Epoxid.

MS: m/e = 628 (5.9 %, M^+), 568 (3.6 %), 508 (2.8 %), 491 (3.8 %) 448 (6 %), 433 (6.9 %), 420 (3.8 %), 419 (4.1 %), 375 (3.4 %), 373 (6.4 %), 313 (7.2 %), 311 (13 %), 297 (18 %), 258 (19 %), 209 (100 %), 177 (40 %), 137 (41 %), 121 (74 %), 107 (43 %),

105 (34 %), 93 (29.5 %), 91 (31.5 %). Die Interpretation der Fragmente ist identisch mit der vom MS von 30a).

^{1}H-NMR: Abb. 16, Interpretation Tab. 8.

^{13}C-NMR: Zugeordnete Daten Tab. 9.

4.) Photooxidation von 3-substituierten Furanen in aprotischen Lösungsmitteln.

Photooxidation von Toonacilin (26)

Eine Lösung von 1 g (26) in 500 ml absolutem Benzol wird ohne Zusatz eines Sensibilisators unter Belichtung einer Quecksilber-Hochdruck-UV-Lampe bei 13-18°C mit Sauerstoff begast. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch verfolgt. (Kieselgel-Alufolien, Fließmittel: Petrolaether 30-50°C/Essigester (3:7); R_f-Werte: (26): 0.65, (28): 0.21, (29): 0.34, (34): 0.32, Detektion durch Besprühen mit konz. H_2SO_4 und Erhitzen 1 Min. 130°C). Sie ist nach 4.5 Std. beendet. (26) ist völlig umgesetzt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer abgezogen (Badtemp. 45°C) und der Rückstand über 80 g Kieselgel mit Petrolaether 30-50°C/Essigester (3:7) chromatographiert. Dabei werden nacheinander 300 mg reines (26), 140 mg relativ unpolare Verunreinigungen, 170 mg Mischfraktion und 250 mg reines (28) erhalten. Aus der Mischfraktion werden durch praep. HPLC (Glassäule 250 x 25 nm mit 60 g LiChroprep Si 60, 15-25 µ (E.Merck) N_{th}: 1165 Böden, Durchfluß 10.5 ml/Min., UV-Detektion bei 263 nm) mit demselben Laufmittel nacheinander 20 mg (29) noch unrein, 70 mg (34) rein und 80 mg (28) rein erhalten. 3 mg reines (29) kann durch praep. DC (DC-Alufolien Kieselgel 60F_{254}, E. Merck) und 3-faches Entwickeln mit dem oben verwendeten Laufmittel gewonnen werden. Die Elution vom Träger erfolgt mit Aceton.

Ausbeute an isolierten Oxidationsprodukten bezogen auf (26): 330 mg (28) = 31.2 %, 3 mg (29) = 0.3 %, 70 mg (34) = 6.6 %; Rückgewinnung von (26): 300 mg = 30 %.

IR, MS und ^{1}H-NMR (vergl. Abb.18) der isomeren γ-Hydroxybutenolide (28) und (29) sind identisch mit denen der Naturprodukte.

22, 23-Epoxytoonacilid (34): $C_{31}H_{38}O_{11}$, ber. C 63.47 %, H 6.53 %, gef. C 63.03 %, H 6.37 %, Schmp. 177-8°C (Chloroform/Aether).

IR: (KBr, cm^{-1}): 3082 ($=CH_2$), 3025 ($=C<^{R}_{H}$), 1798 (Carbonyl des β,γ-Epoxybutanolids), 1745 (Estercarbonyl), 1675 (α,β unges. 6-Ringketon), 1240 (C-O), 930 ($=CH_2$), 840 (Epoxid).

MS: m/e 586 (0.8 %, M^+), 542 (1.3 %, $M^+ - CO_2$), 526 (0.9 %, $M^+ - CH_3COOH$), 466 (1.6 %, $M^+ - 2 \times CH_3COOH$), 391 (3.2 %), 377 (4 %), 209 (100 %, Ring-A-Fragment), 177 (34.3 %, Ring-A-Fragment $-CH_3OH$), 137 (22.2 %, Ring-A-Fragment $-C_5$-Seitenkette), 121 (39.5 %), 107 (24 %), 93 (16 %), 91 (20 %).

^{1}H-NMR: (δ, ppm bezogen auf TMS = 0, J-Werte in Hz, Lsgm.: $CDCl_3$) 0.99 (3H, s, CH_3-19), 1.08 (6H, s, CH_3-28 u. 29), 1.23 (3H, s, CH_3-18), 1.91 (3H, s, CH_3-COO), 2.05 (3H, s, CH_3COO), 1.97-2.59 (6H, m, H^5, H^6, H^{16}, H^{17}), 2.59 (1H, br.s, H^9), 3.03 (1H, dd, 2 x 2.5 Hz, H^{20}), 3.65 (3H, s, $COOCH_3$), 3.78 (1H, dd, 2 x 2.5 Hz, H^{22}), 3.91 (1H, br.s, H^{15}), 5.23 (1H, d, 4.1 Hz, H^{12}), 5.24 (1H, d, 0.9 Hz, $H^{30/1}$), 5.38 (1H, d, 0.9Hz, $H^{30/2}$), 5.47 (1H, d, 4.1 Hz, H^{11}), 5.55 (1H, d, 2.5 Hz, H^{23}), 6.18 (1H, d, 10.5 Hz, H^2), 7.15 (1H, d, 10.5 Hz, H^1).

^{13}C-NMR: (δ, ppm, bezogen auf TMS = 0, Lsgm. $CDCl_3$)

C^1	d 151,3	C^{11}	d 69.9	C^{21}	s 174.0
C^2	d 126.9	C^{12}	d 75.9	C^{22}	d 53.1
C^3	s 202.4	C^{13}	s 41.9	C^{23}	d 76.9
C^4	s 45.9	C^{14}	s 71.3	C^{28}	q 22.7[+]
C^5	d 41.7	C^{15}	d 60.3	C^{29}	q 23.0[+]
C^6	t 31.9	C^{16}	t 28.5	C^{30}	t 121.4
C^7	s 174.3	C^{17}	d 44.2	OCH_3	q 51.9
C^8	s 135.2	C^{18}	q 14.6	$\underline{C}H_3COO$	q 20.4
C^9	d 57.4	C^{19}	q 20.0	$\underline{C}H_3COO$	q 20.8
C^{10}	s 44.0	C^{20}	d 43.7	$CH_3\underline{C}OO$	s 168.9
				$CH_3\underline{C}OO$	s 168.9

[+]Die beiden Werte müssen evtl. vertauscht werden.

Die ^{13}C-Signale von (34) wurden durch Vergleich mit dem ^{13}C-NMR von (28) sowie durch zusätzliche selektive ^{1}H-Entkopplungsexperimente vollständig zugeordnet.

Photooxidation von 3-Methylfuran (35):

3-Methylfuran wird nach der Methode von D. M. BURNESS[105] dargestellt. 500 mg 3-Methylfuran gelöst in 15 ml absol. Methylenchlorid werden in Gegenwart einer Spatelspitze Methylenblau als Sensibilisator unter Belichtung durch eine Quecksilberhochdruck-UV-Lampe bei -5 bis 0°C mit Sauerstoff begast. Die Umsetzung ist nach 1 1/4 Stunden beendet (diese Zeit wurde in einer analogen Reaktion ermittelt, die unter gleichen Bedingungen im NMR-Rohr mit CD_2Cl_2 als Lösungsmittel durchgeführt wurde und so NMR-spektroskopisch verfolgt werden konnte). Die Kühlung wird entfernt. Nach 1/2 Stunde wird die Lösung über 1 g Kieselgel filtriert, das sich mit Methylenchlorid angeschlämmt in einem kleinen Chromatographierrohr befindet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer abgezogen (Badtemperatur 15°C) und der Rückstand sofort im Kugelrohr destilliert. Ein Gemisch, das nur aus monomeren Oxydationsprodukten besteht, destilliert bei 28°C und 0.06 Torr fast quantitativ über. Das Destillat (242.7 mg) hat nach NMR (Tab.10) folgende Zusammensetzung (Mol %): (36) 54.4, (37) 9.9, (38) 23.0, (39) 12.7. Aus dem zur Filtration benutzen Kieselgel lassen sich mit Aceton noch 140 mg polymere Produkte eluieren. (38) ist unbeständig. Es verwandelt sich bei 5°C in 7 Tagen in eine feste, methanollösliche, polymere Substanz um, während (36), (37) und (39) in unverändertem Verhältnis im Gemisch erhalten bleiben. Dasselbe Ergebnis erhält man, wenn man das Destillat in 1 ml Methylenchlorid löst, die Lösung in 1 g Kieselgel aufsaugen läßt und nach 10 Minuten mit Methylenchlorid eluiert. Im Eluat befinden sich (36), (37) und (39) im ursprünglichen Verhältnis.

In dem von (38) befreiten Gemisch läßt sich Citraconsäureanhydrid (39) durch Vergleich der Spektren (MS, IR und ^{1}H-NMR) mit der Originalsubstanz, sowie durch GC (Mischspritze, 2m-

Glassäule, 3 % OV 17 auf Gaschrom Q, Säulentemp. 70°C, Einspritzblock 100°C, Trägergas N_2) identifizieren. Unter diesen Bedingungen ist bereits eine beginnende Zersetzung der Produkte festzustellen, (36) und (37) werden nicht getrennt.

Die IR- und Massenspektren wurden daher vom Gemisch (36), (37) und (39)(ca. 5:1:1) aufgenommen und mit denen von reinem (39) verglichen. Da die Spektren von (39) sehr einfach und die IR-Banden bzw. MS-Fragmentpeaks von denen von (36) und (37) verschieden sind, konnten diese durch Vergleich separiert werden, wie die folgende Zusammenstellung zeigt:

MS von (36) und (37) (ca. 5:1): m/e 114 (2 %, M^+ entsprechend der Summenformel $C_5H_6O_3$), 98 (16 %), 85 (35.3 %, $M^+ - H\dot{C}=O$) 70 (9.7 %, $M^+ - CO_2$), 69 (19 %), 58 (100 %, $M^+ - C_3H_6O$), 57 ($M^+ - C_2H_5CO$), 43 (28.7 %), 42 (10.3 %), 41 (36.7 %).

MS von (39): m/e 112 (18.4 %, M^+ entsprechend der Summenformel $C_5H_4O_3$), 69 (8.1 %), 68 (86.5 %, $M^+ - CO_2$), 53 (9.2 %), 44 (9.7 %) 40 (91.9 %), 39 (100 %), 38 (48.1 %), 37 (37.3 %).

IR von (36) und (37) (ca. 5:1) (Film, cm^{-1}): 1798 (Carbonylschwingung des ß,ɣ-Epoxybutanolids), 1152, 1076 (C-O-C), Lacton), 849 (Epoxid).

IR von (39)(Film, cm^{-1}): 1843, 1770 (Carbonylschwingungen des Anhydrids), 1647, 1250, 1237, 980, 898.

^{1}H-NMR der Verbindungen (36) bis (39): Tabelle 10 u. Abb. 19.

Warnung: Das Endoperoxid von 3-Methylfuran ist explosiv. Bei einem 5g-Ansatz war durch zu starken Sauerstoffstrom das Methylenchlorid weitgehend abgedampft. Beim Versuch einer Probenahme bei -5°C mit einer Pasteurpipette erfolgte eine heftige Explosion. Es muß also darauf geachtet werden, daß während der Reaktion nicht zuviel Lösungsmittel abdampft und daß vor dem Einengen der Lösung nach der Reaktion alles Endoperoxid umgelagert ist.

. Isolierung von Toonafolin (40) aus den Blättern von Toona ciliata var. australis.

.) Extraktion

20 kg getrocknete Blätter werden in einer Brabender-Heumühle zu Pulver zermahlen und dann in 2kg-Portionen je 60 Std. nach dem Soxhlet-Verfahren mit Aether extrahiert. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels verbleiben 1117 g Extrakt.

2.) Trennung des Extrakts

Vortrennung

Der Extrakt wird in drei Teile geteilt und jeweils vorgetrennt auf Säule 1: Offene kurze Säule (Ø 14 cm) mit 2.3 kg Kieselgel.
Fließmittel: Methylenchlorid/Aceton (9:1)
Ergebnis aus den 3 Säulen zusammengefaßt:
292 g unpolare Fraktion I
613 g polare Fraktion II
Die noch polareren Stoffe, die vom Kieselgel zurückgehalten werden, werden verworfen.

Entfernung der Chlorophylle aus Fraktion II.

Die polare Fraktion II wird in ca. 6 l Methylenchlorid/Aceton (9:1) gelöst, mit 735 g Aktivkohle (p.a., E. Merck, Darmstadt) versetzt, kurz aufgekocht und über Nacht stehengelassen. Nach Abfiltrieren der Aktivkohle und Abziehen des Lösungsmittels verbleiben 536 g Fraktion II als braune, harzige Masse.

Auftrennung der Fraktion II:

Säule 2: Offene Säule mit 4 kg Kieselgel.
Fließmittel: Petrolaether 30-50°/Essigester; (7:3, 6:4, 1:1), dann reiner Essigester.

Ergebnis: 13 Fraktionen, die jeweils in 0.5 proz., methanolischer Lösung auf Antifeeding-Aktivität getestet werden. Die größte Aktivität zeigen die mit PE/EE 1:1 eluierten Fraktionen, die Toonafolin enthalten (43.7 g). Die Trennung wird dünnschichtchromatographisch auf SiO_2-Alufolien mit Methylenchlorid/Essigester (9:1) verfolgt. Toonafolin hat dabei einen R_f-Wert von 0.39. Es färbt schmutzigblau an beim Besprühen mit konz. H_2SO_4 und Erwärmen (0.5 Min. bei 130°C).

Abtrennung von Toonafolin (40):

Chromatographie der Toonafolin-Fraktion auf
Säule 3: Offene Säule mit 2 kg Kieselgel.
Fließmittel: Methylenchlorid/Essigester (87.5:12.5)
Ergebnis: Zwei Fraktionen (zusammen 6.72 g) enthalten Toonafolin. Diese werden in etwa 25 ml Essigester gelöst und mit Aether bis zur ersten Trübung versetzt. Dabei scheidet sich Toonafolin feinkristallin aus. Es wird abgetrennt, mit wenig Aether gewaschen und aus Essigester/Aether umkristallisiert.

Gesamtausbeute 455 mg Toonafolin (40); Schmp. 271°C (Zers.) α_D^{20}: +73.8° ($CHCl_3$, c = 1), $C_{26}H_{32}O_6$; Hochaufgelöstes MS: Ber. m/e = 440.21990, gef. m/e = 440.21941; ber. C: 70.89 %, H: 7.32 %, gef. C: 70.43 %, H: 7.31 %. Spektren: IR: Abb. 31, Interpretation S. 92; MS: Abb. 29, Interpretation S. 90, ^{1}H-NMR: Abb. 22, Interpretation Tab. 11, ^{13}C-NMR: Abb. 21, Zuordnung Abb. 28, CD: Abb. 33, Interpretation S. 94.

3.) Chemische Umwandlungen zur Aufklärung der Konstitution von Toonafolin (40).

Versuch zur Generierung des Trimethylsilylenolaethers (VI) oder (VII) aus Toonafolin.

In ein Y-förmiges Reaktionsgefäß werden in einen Schenkel 73 mg (0.17 m Mol) Toonafolin und in den anderen 0.5 mg Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF, mit 20 % H_2O, Fluka) gegeben und zwar in einer Glovebox unter trockenem Argon. Die Substanzen

werden über Nacht bei 45°C und etwa 0.005 Torr getrocknet. Nach Abkühlung und Begasung mit trockenem Argon werden bei Raumtemperatur 40 µl (35.6 mg = 0.22 mMol) Aethyltrimethylsilylacetat (ETSA, Fluka) durch ein Septum in den Schenkel gegeben, der Toonafolin enthält. Die dort entstandene Suspension wird mit 500 µl absolutem, über $LiAlH_4$-destilliertem Tetrahydrofuran in den Schenkel gespült, der das TBAF enthält. Das Reaktionsgemisch wird während 4 Std. unter schwachem Argonstrom mehrmals kurz zum Sieden erhitzt, wobei es in Lösung geht, beim Abkühlen jedoch wieder eine Suspension bildet. Nun werden THF und Reagenzien bei 45°C im Hochvakuum vollständig abgezogen, der Rückstand in $CDCl_3$ gelöst, durch Watte filtriert und ^{1}H-NMR gemessen. Das Spektrum ist mit dem von reinem Toonafolin völlig identisch, obwohl sonst unter den angewandten Bedingungen Ketone selektiv und in sehr guter Ausbeute in Trimethylsilylenolaether überführt werden[82]. Dieses Ergebnis ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß die durch die 1,11-Aetherbrücke erzwungene Verdrillung des Ringes A die Bildung des Δ^2-Enolaethers nicht zuläßt.

Öffnung des Lactonringes unter Bildung des Methylesters (X).

52.6 mg (0.12 mMol) Toonafolin (40) werden in 90 ml Methanol gelöst, mit 1.8 ml 1n KOH in CH_3OH/H_2O 1:1 versetzt und 15 Min. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Lösung wird dann mit ca. 15 ml 0.1 n HCl sorgfältig auf pH 7 eingestellt und am Rotationsverdampfer bei 20°C Badtemperatur so weit eingeengt bis sich eine erste Trübung zeigt. Dann werden 150 ml Wasser zugegeben und 2 x mit Methylenchlorid extrahiert. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel abgezogen. Der Rückstand wird zur Entfernung von Wasser und Methanolspuren noch 2 x in $CDCl_3$ aufgenommen und eingedampft.

Die Lösung von (X) in $CDCl_3$ zeigt im ^{1}H-NMR, daß die Umsetzung quantitativ war. Ausbeute: 56 mg (X) (99 %). Spektren:

IR: (KBr, cm^{-1}): 3475, ν_H, OH; 3135, ν_H, Furan; 1737, ν_{CO}, Methylester; 1715, ν_{CO}, Keton; 1506, ν (C-O-C) Furan;

1261, ν_s (C-O-C), Epoxid; 1074, ν_{as} (C-O-C), Tetrahydrofuranring; 928, ν_s (C-O-C) Tetrahydrofuranring; 873, δ_{oop} (C-H), Furan; 822, ν_{as} (C-O-C) Epoxid.

MS: m/e = 472 (5.6 %, M^+), 454 (10.8 %, $M^+ - H_2O$), 441 (7.5 %, $M^+ - CH_3O$, Methylester), 439 (6 %, $M^+ - CH_3 - H_2O$), 315 (21.1 %), 263 (20.3 %, M^+ - (Ring-A-Fragment ohne Aethersauerstoff) +1), 244 (18.6 %, M^+ - (Ring-A-Fragment mit Aethersauerstoff) -2), 228 (11.7 %)$^+$, 226 (18.1 %, Ring-A-Fragment mit Aethersauerstoff) 210 (13.6 %, Ring-A-Fragment ohne Aethersauerstoff), 189 (17.5 %)$^+$, 177 (16.7 %)$^+$, 163 (52 %)$^+$, 137 (100 %, Ring-A-Fragment ohne Aethersauerstoff - C^5-Seitenkette), 123 (21.5 %)$^+$, 107 (21.7 %)$^+$, 95 (36 %)$^+$, 81 (22.5 %)$^+$, 69 (24.4%)$^+$.

+) Diese Fragmente stammen aus Ring D + Furanring (Vergl. Abb.30)

^{1}H-NMR: (δ, ppm, $CDCl_3$): 1.02, 1.06, 1.10, 1.12 u. 1.21 (s, 5 x 3 H = 5 Methylgruppen), 1.47 - 3.23 (12 H im Methylenbereich, davon 1 OH, nachgewiesen durch D_2O-Austausch), 3.51 (br.s, H^{15}), 3.68 (s, 3H, $-OCH_3$), 3.78 (d,d je 7.9 Hz, H^1), 4.04 (d,d,d; 11.9, 9.4, 7.2 Hz, H^1), 6.20 (m, H^{22}), 7.14 (m, H^{21}), 7.38 (t, H^{23}).

Dehydratisierung von (X) zu (XI):

15 mg (X) werden in 1 ml trockenem Chloroform gelöst und mit 600 µl absolutem Pyridin versetzt. Unter Eiskühlung und Umschütteln werden 120 µl Thionylchlorid tropfenweise zugegeben und das Reaktionsgemisch noch 20 Min. im Eisbad stehengelassen. Dann wird mit Eis zersetzt und 2 x mit je 2 ml Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und uneingeengt über eine 60 g Kieselgel enthaltende Säule mit Methylenchlorid/Essigester (9:1) chromatographiert. Man erhält so 10 mg (69 %) (XI). Spektren:

IR: (CH_2Cl_2, cm^{-1}): 3098, ν_{C-H}, $=CH_2$; 1735, ν_{CO}, Methylester; 1718, ν_{CO}, Keton; 1650, $\nu_{C=C}$, $=CH_2$; 1502, ν (C-O-C), Furan; 1099, ν_{as}, (C-O-C), Tetrahydrofuranring; 913, ν_s (C-O-C), Tetrahydrofuranring; 878, δ_{oop} (C-H), Furan; 819, ν_{as} (C-O-C) Epoxid.

MS: m/e = 454 (37 %, M^+), 439 (3.8 %, $M^+ -CH_3$), 423 (7.4 %, $M^+ -CH_3O$, Methylester), 386 (6.4 %, M^+ -Furan), 372 (8.7 %, M^+ -O , 297 (33 %), 244 (21.5 %, M^+ - (Ring-A-Fragment ohne Aether-Sauerstoff)). 227 (18.2 %, M^+ - (Ring-A-Fragment mit Aethersauerstoff) -1), 210 (25 %, Ring-A-Fragment ohne Aethersauerstoff), 173 (100 %, $C_{11}H_9O_2$, vermutlich aus Ring D mit Furanring entstanden), 163 (16.2 %)$^+$, 157 (26 %), 151 (16.2 %), 149 (30 %), 137 (29 %, Ring-A-Fragment ohne Aethersauerstoff $-C^5$-Seitenkette), 123 (33 %)$^+$, 107 (37 %)$^+$, 95 (55 %)$^+$, 81 (47 %)$^+$, 69 (73 %)$^+$, 57 (69 %), 55 (69 %).

$^{+)}$Diese Fragmente stammen aus Ring-D + Furan (vergl. Abb. 30).

^{1}H-NMR: (δ, ppm, $CDCl_3$): 0.78, 0.86, 1.08, 1.13 (s, 4 x 3 H = 4 Methylgruppen), 1.55 - 3.15 (11 H im Methylenbereich), 3.67 (d,d; je 8.3 Hz, H^1), 3.68 (s, 3H, O-CH_3), 3.84 (br.s , H^{15}), 4.07 (d,d,d, 11.5, 10.8, 6.7 Hz, H^{11}), 5.08 (d, ^3J = 2.8 Hz, $H^{30/1}$ cisoid zu H^9), 5.24 (d, ^3J = 3.2 Hz, $H^{30/2}$ transoid zu H^9), 6.22 (m, H^{22}), 7.17 (m, H^{21}), 7.38 (t, H^{23}).

LITERATUR:

1) Jahresbericht 1977/78 des Industrieverbandes Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel (IPS).

2) U. Claussen in "Chemie der Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel" Springer-Verlag, Berlin 1970, S. 87-118.

3)a) H. Hikino u. T. Takemoto, Naturwiss. 59, 91 (1972).

b) K. Nakanishi et al. in "Natural Products Chemistry" Vol. 1, Academic Press, New York 1974, S. 525-532.

4)a) R.F. Chapman, Bull. ent. Res, 64, 339 (1974).

b) K. Munakata, Pure Appl. Chem. 42, 57 (1975).

c) I. Kubo u. K. Nakanishi, ACS Symp. Ser. 1977, 62 (Host Plant Resist. Pests, Symp.), S. 165-178.

d) K. Munakata, Lit. 4c) S. 185-196.

5) R. Steets, Dissertation Universität Gießen 1976, S. 2, dort umfassende Literaturübersicht über Azadirachta indica A. Juss und Melia azedarach L..

6) J.H. Butterworth, E.D. Morgan u. G.R. Percy, J. Chem. Soc. Perkin I 1972, 2445.

7)a) P.R. Zanno, I. Miura, K. Nakanishi u. D.L. Elder, J. Amer. Chem. Soc. 97, 1975 (1975).

b) K. Nakanishi, Rec. Adv. Phytochem. 9, 283 (1975).

8) D. Lavie, M.K. Jain u. S.R. Shpan-Gabrielith, Chem. Commun. 1967, 910.

9) P. Grijpma u. R. Ramalho, Turrialba 19, 531 (1969).

10) P. Grijpma, Turrialba 20, 85 (1970).

11) P. Grijpma u. S.C. Roberts, Turrialba 25, 152 (1975).

12) G.G. Allan, R.I. Gara u. S.C. Roberts, Turrialba 25, 255 (1975).

13) R. Steets, Lit. 5) S. 97-107.

14) Dem Department of Forestry, Brisbane, Queensland (Australien) sei herzlich gedankt für die Bereitstellung des Pflanzenmaterials.

15) D. Waldi, K. Schnackerz u. F. Munter, J. Chromatog. 6, 61 (1961).

16)a) J.D. Connolly u. K.H. Overton in "Chemistry of Terpenes and Terpenoids" Academic Press London and New York 1972, S. 207-287.

b) T.A. Geissman u. D.H.G. Crout, "Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism", Freeman, Cooper and Co., San Francisco 1969, S. 313-359.

c) D.L. Dreyer, Fortschr. Chem. Org. Naturstoffe 26, 191 (1968).

d) J.D. Connolly u. K.H. Overton, Progr. Phytochem. 2, 385 (1970).

17) I. Kubo, S.P. Tanis, Yue-Wei Lee, I. Miura, K.Nakanishi u. A. Chapya, Heterocycles 5, 485 (1976).

18) R.B. Boar u. K. Damps, J. Chem. Soc. Perkin I 1977, 510.

19) M.M. Rao, H. Meshulam, R. Zelnik u. D. Lavie, Tetrahedron 31, 333 (1975).

20)a) D. Lavie, M.K. Jain u. I. Kirson, J. Chem. Soc. (C) 1967, 1347.

b) C.W. Lyons u. D.R. Taylor, Chem. Commun. 1975, 517.

21) J.I. Okogun, C.O. Fakunle, D.E.U. Ekong u. J.D.Connolly, J. Chem. Soc. Perkin I 1975, 1352.

22) J.D. Connolly u. R.Mc Crindle, J. Chem. Soc. (C) 1971, 1715.

23) D.A. Okorie u. D.A.H. Taylor, J. Chem. Soc. (C) 1968, 1828.

24) D. Lavie u. M.K. Jain, Chem. Commun. 1967, 278.

25) T.G. Halsall u. J.A. Troke, J. Chem. Soc. Perkin I 1975, 1758.

26)a) I.G. Grant, J.A. Hamilton, T.A. Hamor, R. Hodges, S.G.Mc Geachin, R.A. Raphael, J.M. Robertson u. G.A.Sim, Proc. Chem. Soc. 1961, 444.

b) I.G. Grant, J.A. Hamilton, T.A. Hamor, J.M. Robertson und G.A. Sim, J. Chem. Soc. 1963, 2506.

c) R. Hodges, S.G. Mc Geachin und R.A. Raphael, J. Chem Soc. 1963, 2515.

27)a) A. Akisanya, C.W.L. Bevan, T.G. Halsall, J.W. Powell u. D.A.H. Taylor, J. Chem. Soc. 1961, 3705.

b) S.A. Sutherland, G.A. Sim u. J.M. Robertson, Proc.Chem. Soc. 1962, 222.

28) D.L. Dreyer, J. Org. Chem. 30, 749 (1965).
29) W.D. Ollis, A.D. Ward, H. Meirelles de Oliveira u. R. Zelnik, Tetrahedron 26, 1637 (1970).
30) M. Harris, R. Henderson, R. Mc Crindle, K.H. Overton u. D.W. Turner, Tetrahedron 24, 1517 (1968).
31) J.D. Connolly, R. Henderson, R. Mc Crindle, K.H.Overton u. N.S. Bhacca, Tetrahedron Letters 1964, 2593.
32) J.D. Connolly, I.M.S. Thornton, D.A.H. Taylor, Chem. Commun. 1971, 17.
33) J.D. Connolly, R. Mc Crindle u. K.H. Overton, Tetrahedron 24, 1489, 1497 (1968).
34) B.A. Nagasampagi, L. Yankov und Sukh Dev, Tetrahedron Letters 1968, 1913.
35) B.A. Nagasampagi, L. Yankov und Sukh Dev, Tetrahedron Letters 1967, 189.
36) R. Banerji u. C.R. Mitra, Planta medica 28, 52 (1975).
37) Das Massenspektrum des Cedrelons ließ sich auch unmittelbar aus einer Holzprobe erhalten.
38) A. Chatterjee, T. Chakrabortty u. S. Chandrasekharan, Phytochem. 10, 2533 (1971).
39) M. Kocor u. J. St. Pyrek, J. Org. Chem. 38, 3688 (1973).
40) F. Khuong-Huu Laine, M. Sangare, V. M. Chari, A.Bekaert, M. Devys, M. Barbier u. G. Lukacs, Tetrahedron Letters 1975, 1787.
41) R.T. Aplin u. G.M. Hornby, J. Chem. Soc. (B) 1966, 1076.
42) H.W. Strohäcker, Zulassungsarbeit, Universität Hohenheim 1976, S. 44.
43) C. Grundwald, Ann. Rev. Plant Physiol 26, 209 (1975).
44) W. Karrer, "Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe", Birkhäuser Verlag, Basel u. Stuttgart, 1958, Nr. 1043, S. 416.
45) Ich danke Herrn Dr. Haas vom Botanischen Institut der Universität Hohenheim für die Identifizierung der Flechten.
46) Ich danke Herrn Prof. S. Huneck von der Technischen Universität Dresden für die Überlassung einer Probe Zeorin, die durch Herrn Dr. G. Höfle von der Technischen Universität Berlin freundlicherweise vermittelt wurde.

47) PND-PR-FT-^{13}C-NMR = Proton-noise decoupled partially relaxed Fourier transform-^{13}C-NMR. A. Allerhand, D. Doddrell u. R. Komoroski, J. chem. phys. 55, 189 (1971).

48) D. Lavie, E.C. Levy u. R. Zelnik, Bioorganic Chemistry 2, 59 (1972).

49) R. Henderson, R. Mc Crindle, A. Melera u. K.H. Overton, Tetrahedron 24, 1525 (1968).

50) L.M. Jackman u. S. Sternhell, "Applications of Nuclear Magnetic Resonance Spectroskopy in Organic Chemistry" 2nd Ed. Pergamon Press 1969, S. 280-301.

51) D. Lavie, E.C. Levi u. M.K. Jain, Tetrahedron 27, 3927 (1971).

52) W. Kraus u. R. Cramer, Tetrahedron Letters 1978, 2395.

53) Ich danke Herrn Prof. G. Snatzke, Institut für Strukturchemie der Universität Bochum, für die Aufnahme der CD-Spektren und wertvolle Hinweise für die Interpretation.

54) G. Snatzke, Tetrahedron 21, 413 u. 421 (1965).

55) Ich danke Herrn Dr. William E. Hull von der Fa. Bruker-Physik AG, Karlsruhe, für die Aufnahme der 360 MHz-^{1}H-NMR-Spektren.

56) W.R. Chan u. D.R. Taylor, Chem. Commun. 1966, 206.

57) M. Ochi u. H. Kotsuki, Tetrahedron Letters 1976, 2877.

58)a) H. Günther, "NMR-Spektroskopie", Thieme-Verlag Stuttgart 1973, S. 176.

b) R.J. Abraham, "The Analysis of High Resolution NMR Spectra", Elsevier 1971, S. 58.

59) Pretsch, Clerc, Seibl u. Simon, "Tabellen zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen mit spektroskopischen Methoden", Springer 1976, S. H205.

60) B. Birdsall, N.J.M. Birdsall u. J. Feeney, Chem.Commun. 1972, 316.

61) S. Takeuchi, J. Uzawa, H. Seto u. H. Yonehara, Tetrahedron Letters 1977, 2943.

62) D.A.H. Taylor, J. Chem. Soc. Perkin I 1974, 437.

63) H. Günzler, H. Böck, "IR-Spektroskopie", Verlag Chemie, Weinheim 1975.

64) Pretsch, Clerk, Seibl, Simon, Lit. 59) S. I 5-140.

65) M. Kraft, "Struktur und Absorbtionsspektroskopie der Steroide und Alkaloide", Thieme-Verlag Stuttgart 1975, S. 101 (geminale Methylgruppen).

66) J. Seibl, "Massenspektrometrie", Akad. Verlagsges. Frankfurt/M. 2. Aufl. 1974.

67) E. Breitmaier u. G. Bauer, "^{13}C-NMR-Spektroskopie", Thieme-Verlag Stuttgart 1977, S. 31.

68) Pretsch, Clerc, Seibl, Simon, Lit. 59) S. C 220.

69) W. Krauss, W. Grimminger u. G. Sawitzki, Angew. Chem. 90, 476 (1978). Die Röntgenstrukturanalyse führte Frau Dr. Gisela Sawitzki durch.

70) C.K. Johnson, ORTEP ORNL - 3794, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tennessee (1971).

71) Vgl. M.M. Rao, H. Meshulam, R. Zelnik u. D. Lavie, Phytochem. 14, 1071 (1975).

72) R.W. Denny u. A. Nickon, Organic Reactions 20, 133 (1973).

73) N. Kornblum und H.E. De La Mare, J. Amer. Chem. Soc. 73, 880 (1951).

74) Die Photooxidation von (35) in Aethanol liefert γ-Hydroxy- und γ-Aethoxybutenolide, aber keine Epoxybutanolide[75].

75)a) J.P. van der Merve u. C.F. Garbers, J.S. African Chem. Inst. 17, 149 (1964) [C.A. 62, 9088e (1965)].

b) F. Farina u. M.V. Martin, Anales de Quimica (Madrid) 67, 315 (1971).

76) H. Takeshita, H. Kanamori u. T. Hatsui, Tetrahedron Letters 1973, 3139.

77) ETSA = Aethyltrimethylsilylacetat, TBAF = Tetrabutylammoniumfluorid.

78)a) E. Nakamura, T. Murofushi, M. Shimizu u. I. Kuwajima, J. Amer. Chem. Soc. 98, 2346 (1976).

b) E. Nakamura, M. Shimuzu u. I. Kuwajima, Tetrahedron Letters 1976, 1699.

79) I.D. Campell, C.M. Dobson, R.J.P. Williams und A.V. Xavier, J. Magn. Res. 11, 172 (1973). Für die Erläuterung und Vorführung der bei der Fa. Bruker, Karlsruhe,

weiterentwickelten Methode danke ich Herrn Dr. William E. Hull.

80) Vergl. J.W. Cooper in "Topics in Carbon-13-NMR-Spectroscopy" Vol. 2, New York 1976, S. 426 und E. Breitmaier u. G. Bauer, Lit 67) S. 12.

81) Ich danke Herrn Prof. G. Snatzke vom Institut für Strukturchemie der Universität Bochum für die Computer-Zeichnung des ABX-Systems H^5-H^6 aus dem ^{1}H-NMR-Spektrum von Toonafolin.

82) L.M. Jackman u. S. Sternhell, Lit 50) S. 274.

83) W.E. Hull, Bruker Report 1, 4 (1978).

84) D.L. Dreyer, Tetrahedron 24, 3273 (1968).

85) G. Snatzke u. F. Snatzke in "Fundamental Aspects and Recent Developments in Optical Rotatory Dispersion and Circular Dichroism", Heyden u. Son Ltd. 1973, S. 109.

86) C. Djerassi u. W. Klyne, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 48, 1093 (1962).

87) D.N. Kirk, J. Chem. Soc. Perkin I 1976, 2171.

88) H. Wolf, Tetrahedron Letters 1966, 5151.

89) C.G. Overberger u. H. Kaye, J. Amer. Chem. Soc. 89, 5646 (1967).

90) M. Legrand u. R. Bucourt, Bull. Soc. Chim. Fr. 1967, 2241.

91) R. Steets, loc. cit. S. 7-16.

92) Frau S. Bossert vom Chemischen Institut der Universität Stuttgart-Hohenheim führte die Zucht der Mexikanischen Bohnenkäfer sowie der Buschbohnen und einen Teil der Tests durch.

93) S. Hosozawa, N. Kato u. K. Munakata, Agr. Biol. Chem. 38, 823 (1974).

94) S. Hosozawa, N. Kato, K. Munakata u. Yuh-Lin Chen, Agr. Biol. Chem. 38, 1045 (1974).

95) I. Kubo, Y.-W. Lee, M.J. Pettei, F. Pilkiewitz und K. Nakanishi, Chem. Commun. 1976, 1013.

96) M.L. Dhar, M.M. Dhar, B.N. Dhawan, B.N. Mehrotra u. C. Ray, Indian. J. Exp. Biol. 6, 232 (1968).

97) Ich danke Herrn Prof. H. Engelhardt und seinen Mitarbeitern von der Universität Saarbrücken für die Hilfe

bei der Zusammenstellung des analytischen Hochdruck-flüssigchromatographen.

98) G. Deininger u. I. Halász, J. Chromatogr. 60, 65 (1971).

99) B. Glatz, Dissertation Universität Stuttgart 1976, S. 102.

100) J.S.C. Cox, F.F. King u. T.J. King, J. Chem. Soc. 1959, 514.

101) S. Huneck, Progr. Phytochem. 1, 223 (1968).

102) S. Huneck, C. Djerassi, D. Becher, M. Barber, M. v. Ardenne, K. Steinfelder u. R. Tümmler, Tetrahedron 24, 2707 (1968).

103) S. Huneck u. P. Linscheid, Z. Naturforsch. (B) 23, 715 (1968).

104) I. Yoshioka, T. Nakanishi, H. Yamauchi u. I. Kitagawa, Tetrahedron Letters 1971, 1161.

105) D.M. Burness, Org. Synth. Coll, Vol. IV, S. 628, New York 1963.

LEBENSLAUF

26.2.1940	Geboren in Stuttgart; Vater: Alfred Grimminger, Malermeister; Mutter: Erna Grimminger geb. Grau.
1946-1950	Grundschule in Stuttgart-Zuffenhausen.
1950-1956	Gymnasium in Stuttgart-Zuffenhausen.
1956-1959	Lehre als Lacklaborant bei der Fa. Karl Wörwag, Lackfabrik in Stuttgart.
1959-1963	Anstellung als Lacklaborant bei derselben Firma.
1963-1964	Ziviler Ersatzdienst am Max-Planck-Institut für Arbeitsphysiologie in Dortmund.
1964-1965	5 Mon. Praktikum am Max-Planck-Institut für Ernährungsphysiologie in Dortmund.
1965-1968	Studium an der staatl. Chemieschule - Ingenieur-Schule - in Darmstadt.
20.2.1968	Abschluß als Ing. grad.
1968-1970	Anstellung als Chemie-Ingenieur bei der Fa. F. Hoffmann-La Roche u. Co. AG in Basel.
26.1.1970	Fachgebundene Hochschulreife vom Hessischen Kultusminister, Wiesbaden.
1970-1974	Studium der Chemie an der Universität Tübingen.
20.9.1974	Diplom in Chemie.
1974-1978	Dissertation bei Prof. Dr. Wolfgang Kraus.
Seit 1.10.75	Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Chemie der Universität Hohenheim.

Meine akademischen Lehrer waren - neben Prof. Dr. W. Kraus - Frau Prof. Kemmler-Sack und die Herren Professoren und Dozenten: E. Bayer, Braun, Breitmaier, Dähn, Häfelinger, Hagenmaier, Hanack, Jung, König, Kortüm, Krüger, Lindner, Machleidt, Maeser, Meier, Eu. Müller, Oelkrug, Opitz, Pauschmann, Pausewang, Pracht, Rau, Rundel, Rieker, Rüdorff, Seelig, Stumpp, Suhr, Voelter, Zeil.

Druck: Polyfoto Vogt KG
Forststr. 58, Tel. 0711/610641-42
7000 Stuttgart 1

Druck: Polyfoto Vogt KG
Forststr. 58, Tel. 0711/610641-42
7000 Stuttgart 1